



IMPLICATION DE LA SUBÉRINE DANS LA RÉGULATION DE L'ACTIVITÉ  
CELLULOLYTIQUE DES ESPÈCES DE *STREPTOMYCES* CAUSANT LA GALE  
COMMUNE DE LA POMME DE TERRE

par

Rebeca Padilla Reynaud

thèse présentée au Département de biologie en vue  
de l'obtention du grade de docteur ès sciences (Ph.D.)

FACULTÉ DES SCIENCES  
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, le 25 avril 2017.

Le 25 avril 2017

*le jury a accepté la thèse de Madame Rebeca Padilla Reynaud  
dans sa version finale.*

Membres du jury

Professeure Carole Beaulieu  
Directrice de recherche  
Département de Biologie, Université de Sherbrooke

Professeur Pierre-Mathieu Charest  
Évaluateur externe  
Université Laval

Professeure Nathalie Beaudoin  
Évaluateur interne  
Département de Biologie, Université de Sherbrooke

Professeur Kamal Bouarab  
Président-rapporteur  
Département de Biologie, Université de Sherbrooke

***Cette thèse est dédiée à mon grand-père Tarsicio et à mon fils Arnaud.  
Vous deux avez changé ma vie.***

## SOMMAIRE

L'agent phytopathogène *Streptomyces scabiei* est une bactérie du phylum actinobactérie présent dans les sols à travers le monde. *S. scabiei* est l'agent principal responsable de la gale commune de la pomme de terre. Cette maladie est coûteuse pour les producteurs de la pomme de terre. En effet, la pomme de terre va perdre sa valeur commerciale lorsque la bactérie attaque le périoderme du tubercule et provoque des lésions liégeuses en surface ou plus ou moins en profondeur. C'est dans le périoderme de la pomme de terre que la subérine va se déposer pour protéger le tubercule des agressions biotiques. Des études antérieures ont mis en évidence le rôle de la subérine comme inducteur de la production de thaxtomine A (phytotoxine essentielle à la virulence) chez *S. scabiei*. De même, la subérine va induire chez *S. scabiei*, la sécrétion d'enzymes dégradant les parois végétales, en particulier des glycosyl hydrolases, dont des cellulases.

Cette thèse vise à élucider les mécanismes impliqués dans la production de cellulases chez la souche *S. scabiei* EF-35. Dans un premier temps, le sécrétome de *S. scabiei* ayant poussé en présence de subérine et cellulose, soit avec un seul des deux polymères, a été analysé. Ces analyses du sécrétome ont révélé que l'addition de subérine dans un milieu contenant de la cellulose induisait une surproduction de glycosyl hydrolases. L'induction des enzymes cellulolytiques par la subérine, corrélait avec la présence d'un inhibiteur de subtilase (SCAB\_8801) qui pourrait jouer un rôle dans la différenciation cellulaire et le métabolisme secondaire. Ces résultats ont permis d'avancer un modèle dans lequel la subérine et le cellobiose jouent conjointement un rôle pour activer les mécanismes de virulence de la bactérie.

Dans un deuxième temps, nous avons voulu savoir si le cellobiose (la molécule résultante de la dégradation de la cellulose) induisait des enzymes cellulolytiques

chez *S. scabiei*, mais aussi chez deux autres espèces de *Streptomyces* pathogènes et une espèce de *Streptomyces* non pathogène. L'activité cellulolytique de *S. scabiei* en présence de subérine est beaucoup plus importante que lorsque la bactérie est en présence de cellobiose (de cinq à dix fois supérieure). De même, la présence de subérine dans le milieu de culture de *S. scabiei* augmente l'expression relative des gènes des cellulases. Les deux autres *Streptomyces* pathogènes (*S. acidiscabies* et *S. turgidiscabies*) exhibent un profil contraire à *S. scabiei*. En effet, *S. acidiscabies* et *S. turgidiscabies* affichent une activité cellulolytique et une expression relative des gènes de cellulases plus importante dans le milieu supplémenté de cellobiose que dans le milieu supplémenté de subérine. *Streptomyces scabiei* semble donc mieux adaptée que les autres espèces de *Streptomyces* à dégrader le matériel cellulosique encastré dans les parois subérisées du périderme.

Les résultats présentés dans cette thèse visent à apporter des éléments de réponse pour mieux comprendre les interactions *S. scabiei* – pomme de terre. Ainsi, les biopolymères retrouvés dans la pomme de terre (subérine et cellulose) vont jouer un rôle crucial dans la virulence de l'agent phytopathogène. Cependant, il semblerait que *S. scabiei* s'est spécialisé au cours du temps à coloniser son hôte, la pomme de terre. La subérine induit la production de cellulases chez *S. scabiei* mais pas chez les autres deux *Streptomyces* pathogènes testés (*S. acidiscabies* et *S. turgidiscabies*). Ceci nous laisse penser que la subérine est impliquée dans des mécanismes qui restent encore à élucider.

Mots clés : Enzymes cellulolytiques, subérine, *Streptomyces scabiei*, cellulose, cellobiose.

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier ma directrice, Dre Carole Beaulieu de m'avoir acceptée dans son laboratoire. Merci pour votre temps et surtout merci pour avoir partagé toutes vos connaissances et votre passion vis-à-vis des actinobactéries avec moi. Je vois les bactéries d'une autre façon maintenant.

Merci à mes conseillers, Dre Nathalie Beaudoin et Dr Kamal Bouarab de m'avoir accompagné tout au long de cette thèse. Merci pour vos suggestions et votre disponibilité. Merci au Dr Pierre-Mathieu Charest d'avoir accepté d'être mon évaluateur externe.

Cette thèse m'a permis de rencontrer des gens extraordinaires qui ont fait de moi une meilleure personne. Merci à Anne-Marie, sans toi, ça aurait été très difficile de finir. Merci Sylvain, malgré nos différends on a partagé des nombreux fous-rires. Merci Mina et Raoudha, pour votre gentillesse et votre amitié. Merci Hélène pour tes bonnes ondes et ton affection. Merci mon Pascalou, t'es ma « muse ». Ta présence égayait mes journées au labo! Puerto Vallarta restera à jamais gravé dans ma mémoire.

Merci à mon père qui m'a toujours poussé vers les études et qui ne m'a jamais lâché. Merci à ma mère qui a été là quand j'avais besoin d'elle. Merci à mon frère, le meilleur frère que personne peut avoir. T'es mon idole.

Merci à mes beaux-parents qui ont été toujours là dans les bons et les mauvais moments, j'ai la chance de vous avoir.

Merci à toi mon époux. Merci de m'avoir donné la chance de vivre une autre aventure à tes côtes. Certes, on a eu des moments durs mais ça a solidifié notre couple et puis....la chose la plus merveilleuse au monde est arrivée. Merci mon Arnaud (Aito), car t'avoir dans ma vie est le cadeau le plus grand de l'univers. Tous les jours je suis heureuse de t'avoir. Tu es mon bonheur et tu me rappelles ce qui est important dans la vie. Je vous aime.

## TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	v
REMERCIEMENTS.....	vii
TABLE DES MATIÈRES .....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xi
LISTE DES TABLEAUX .....	xiv
CHAPITRE 1 .....	1
INTRODUCTION GÉNÉRALE .....	1
1.1. La pomme de terre.....	1
1.2. Importance mondiale .....	1
1.3. La pomme de terre au Canada .....	1
1.4. Structure du tubercule de la pomme de terre.....	2
1.4.1. Cellule du tubercule de la pomme de terre .....	3
1.4.2. La paroi végétale. ....	4
1.4.2.1. Lamelle moyenne .....	5
1.4.2.2. La paroi primaire .....	5
1.4.2.3. La paroi secondaire .....	7
1.4.2.3.1. Le périderme .....	7
1.4.2.3.2. La subérine .....	9
1.4.3. Le parenchyme .....	12
1.4.4. Les faisceaux vasculaires.....	13
1.5. Maladies de la pomme de terre .....	13
1.5.1. Les plus communes.....	13



1.5.2 La gale commune de la pomme de terre .....	14
1.6. Le genre <i>Streptomyces</i> .....	17
1.6.1. <i>Streptomyces scabiei</i> .....	19
1.6.2. Cycle de vie de <i>S. scabiei</i> .....	21
1.6.3. Le pouvoir pathogène .....	22
1.6.3.1. La production des toxines .....	22
1.6.3.1.1. Les thaxtomines .....	23
1.6.3.1.1.1. Synthèse de la thaxtomine .....	25
1.6.3.1.1.2. Les possibles inducteurs de la synthèse de la thaxtomine .....	26
1.6.3.1.2. Les concanamycines .....	28
1.6.3.1.3. La coronatine .....	28
1.6.3.2. La dégradation du périderme de la pomme de terre .....	29
1.6.3.2.1. Enzymes extracellulaires pouvant être impliquées dans la dégradation de la paroi végétale .....	31
1.6.3.2.2. Les enzymes pouvant dégrader la subérine .....	32
1.6.3.2.3. Les glycosides hydrolases .....	34
1.6.3.2.4. Induction des cellulases chez le genre <i>Streptomyces</i> .....	37
1.7. Voies de sécrétion .....	38
1.7.1. Voie Sec .....	38
1.7.2. Voie Tat .....	40
1.7.3. Voie ESX .....	42
1.8. Hypothèses de recherche .....	43
1.9. Objectif du projet doctoral .....	43
CHAPITRE 2 .....	45

LA SUBÉRINE RÉGULE LA PRODUCTION DES ENZYMES CELLULOLYTIQUES CHEZ <i>STREPTOMYCES SCABIEI</i> , L'AGENT PATHOGÈNE RESPONSABLE DE LA GALE COMMUNE DE LA POMME DE TERRE.....	45
2.1. Préambule .....	45
2.2. Suberin regulates the production of cellulolytic enzymes in <i>Streptomyces scabiei</i> , the causal agent of potato common scab .....	47
CHAPITRE 3 .....	96
COMPARAISON DE L'HABILETÉ CELLULOLYTIQUE D'ESPÈCES DE <i>STREPTOMYCES</i> PATHOGÈNES ET NON PATHOGÈNES EN RÉPONSE AU CELLOBIOSE ET À LA SUBÉRINE DE POMME DE TERRE.....	96
3.1. Préambule. ....	96
3.2 Comparative cellulolytic ability of pathogenic and non-pathogenic <i>Streptomyces</i> species in response to cellobiose and potato suberin. ....	98
CHAPITRE 4 .....	156
DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION .....	156
BIBLIOGRAPHIE.....	162
ANNEXE. PURIFICATION DE SUBÉRINE.....	177

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

% : Pourcentage

µg : Microgrammes

kg : Kilogrammes

AGU: D-anhydroglucopyranose

µm : Micromètre

µL : Microlitre

°C : Degré Celsius

ARN : Acide Ribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

C : Cytosine

Ca<sup>2+</sup> : Calcium

CAZY : Carbohydrate-Active enZymes

Ceb : Cellobiose binding protein

CFA : Acide coronafacique

CHAPS : 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate

CM : Control medium

CM+C : Control medium supplemented with cellulose

CM+Ce : Control medium supplemented with cellobiose

CM+C+S : Control medium supplemented with cellulose+suberin

CM+S : Control medium supplemented with suberin

CM+X : Control medium supplemented with xylan

CM+L : Control medium supplemented with lichenan

CMC : Carboxyméthyl cellulose

COG : Clusters of Orthologous Groups of proteins

Da : Daltons

DNA : Desoxyribonucleic Acid

DTT : Dithiothréitol

g : Gramme  
G : Guanine  
GH : Glycosyl Hydrolases  
h : Heure  
HPLC : High Performance Liquid Chromatography  
IPG : Immobilized pG gradient  
IUBMB : International Union of Biochemistry and Molecular Biology  
KEGG : Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes  
L : Litre  
LSD : Least Significant Difference  
min : Minutes  
mg : Milligrammes  
mL : Millilitre  
mM : Millimoles  
mU : MilliUnité  
MS : Mass Spectrometer  
MW : Molecular Weight  
ng : Nanogramme  
NaCl : Chlorure de sodium  
NCBI : National Center for Biotechnology Information  
NSAF : Normalized Spectral Abundance Factor  
PCR : Polymerase Chain Reaction (Réaction en chaîne par polymérisation)  
pH : Potentiel hydrogène  
ppm : Parties par million  
PRIAM : Profils pour l'Identification Automatique du Métabolisme  
Qq-TOF : Mass spectrometer type quadrupole time-of-flight  
rpm : Rotation per minute  
RT-PCR : Reverse Transcriptase polymerase chain reaction  
RT-qPCR : Real time quantitative polymerase chain reaction  
s : Second

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide gel electrophoresis

SpC : Number of Spectral counts

SRP : Signal de Reconnaissance des Particules

Tat : Twin Arginine Translocation

TRIS : Tris(hydroxymethyl)aminomethane

v/v : Volume per volume

w/v : Weight per volume

YME : Yeast Malt Extract

## LISTE DES TABLEAUX

### CHAPITRE II

Table 2. 1.	Primers used in this study .....	55
Table 2. 2.	Comparison of <i>Streptomyces scabiei</i> growth. ....	59
Table 2. 3.	Proteins involved in carbohydrate transport and metabolism. ....	61
Table S2.	Proteins produced by <i>Streptomyces scabiei</i> EF-35.....	81

### CHAPITRE III

Table 3. 1.	List of primers used in this study. ....	104
Table 3. 2.	Relative expression level of targeted cellulase genes. ....	111
Table 3. 3.	Relative cellulase activity. ....	113
Table 3. 4.	Distribution within functional groups of <i>Streptomyces scabiei</i> strain EF-35.....	116
Table 3. 5.	Predicted extracellular proteins of <i>Streptomyces scabiei</i> strain EF-35. ....	118
Table S3.	Proteins produced by <i>Streptomyces scabiei</i> EF-35.....	132

## LISTE DES FIGURES

### CHAPITRE I

Figure 1. 1. Représentation d'une coupe longitudinale du tubercule de pomme de terre.....	3
Figure 1. 2. Representation d'une cellule végétale et de ses parois. ....	4
Figure 1. 3. Structure de la cellulose. ....	6
Figure 1. 4. Structure du périoderme de la pomme de terre.....	9
Figure 1. 5. Structure hypothétique de la subérine (modifiée de Bernards, 2002). ....	11
Figure 1. 6. Structure hypothétique de la subérine (modifiée de Graça, 2015). ....	12
Figure 1. 7. Coupe transversale du tubercule de la pomme de terre.....	13
Figure 1. 8. Différents degrés d'atteinte de la gale commune de la pomme de terre (Dallaire, 2007). ....	16
Figure 1. 9. Morphologie classique des hyphes et des spores de <i>Streptomyces</i> . ....	19
Figure 1. 10. Morphologie de <i>Streptomyces scabiei</i> souche EF-35. ....	21
Figure 1. 11. Cycle de la maladie de la gale commune de la pomme de terre causée par <i>S. scabiei</i> . (Adapté d'Agrios, 2005). ....	22

Figure 1. 12. Formules structurales des thaxtomines.....	24
Figure 1. 13. Organisation du groupe de gènes responsables de la biosynthèse de la thaxtomine chez <i>S. scabiei</i> souche 87.22 (Bignell <i>et al.</i> , 2010). ....	27
Figure 1. 14. Voie de synthèse hypothétique de la thaxtomine A (Barry <i>et al.</i> , 2012). ....	28
Figure 1. 15. Colonisation des tissus de la pomme de terre par <i>S. scabiei</i> . ....	30
Figure 1. 16. Organisation des cellules de la paroi de la pomme de terre.....	31
Figure 1. 17. Les trois types de sites actifs retrouvés chez les glycosyl hydrolases.....	37
Figure 1. 18. Schéma de la voie de sécrétion Sec (adapté de Mori et Ito, 2001). ....	40
Figure 1. 19. Schéma de la voie Tat (adapté de Palmer <i>et al.</i> , 2012) .....	42

## CHAPITRE II

Figure 2. 1. Normalized spectral abundance factor (NSAF) within functional groups of <i>Streptomyces scabiei</i> strain EF-35.....	67
Figure 2. 2. Relative expression levels ( $\pm$ SD) of eleven targeted cellulases. ....	69



Figure 2. 3. Model of the onset of <i>Streptomyces scabiei</i> virulence mechanism by both cellulose and suberin.....	74
---	----

### CHAPITRE III

Figure 3. 1. Relative enzymatic activity of <i>Streptomyces scabiei</i> strains EF-35 and 87.22. ....	114
---	-----

## CHAPITRE 1

### INTRODUCTION GÉNÉRALE

#### 1.1. La pomme de terre

La pomme de terre est une plante herbacée vivace annuelle, de l'espèce *Solanum tuberosum*, appartenant à la famille des solanacées. Le terme désigne également le tubercule comestible pour lequel la plante est cultivée. Originaires du sud-ouest de l'Amérique du Sud, elle a été introduite en Europe par les Espagnols (Brown, 1993).

#### 1.2. Importance mondiale

Aliment de base dans différents pays, cultivée dans plus de 150 pays, la pomme de terre est l'aliment non céréalier le plus consommé dans le monde. Elle arrive en quatrième place des cultures vivrières après le maïs, le blé et le riz (Rowe et Powelson, 2002) et cinquième produit agricole mondial, après la tomate, la noix de palme, le soja, le manioc et la betterave à sucre (FAOSTAT-Agriculture, 2007). Elle est source importante des nutriments tels que les glucides, mais aussi des vitamines, minéraux, fibres alimentaires et protéines. En plus d'être consommée sous plusieurs formes, elle est transformée en plusieurs produits, tels que les croustilles, les frites surgelées, les pommes de terre en flocons, les farines, etc. La fécule de pomme de terre est utilisée dans différents secteurs comme la cosmétique, la pharmaceutique, l'industrie ou l'agroalimentaire.

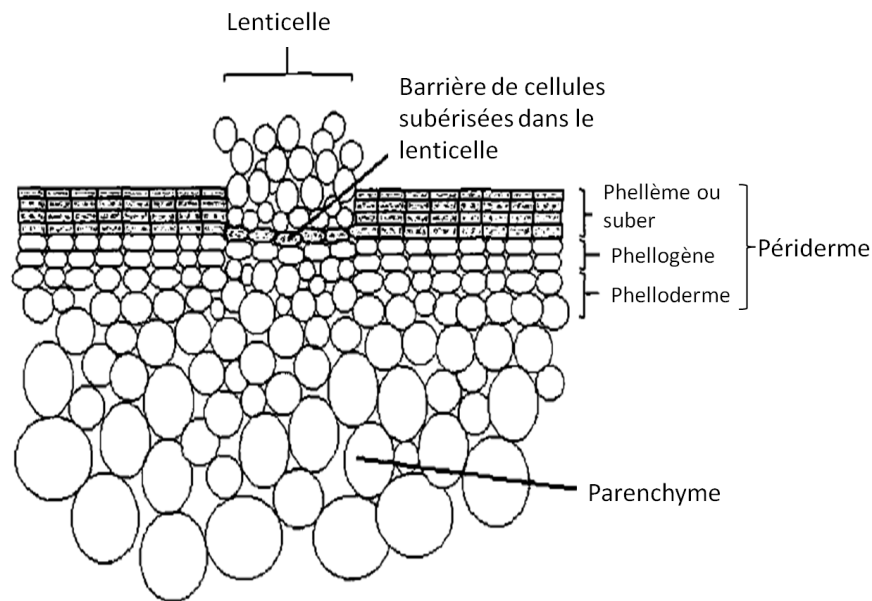
#### 1.3. La pomme de terre au Canada

En 2013, la culture de la pomme de terre occupait une superficie de 142 189 hectares et produisait 4 660 105 tonnes, plaçant le Canada au deuxième rang des

producteurs de pommes de terre en Amérique (après les États-Unis) et au treizième au rang mondial. Cultivées dans toutes les provinces, mais principalement à l'Île-du-Prince-Édouard, au Nouveau-Brunswick, au Manitoba, en Alberta et au Québec, 55% des pommes de terres produites sont transformées en frites congelées et en croustilles. La consommation annuelle moyenne de pomme de terre au Canada est de 56,4 kg par habitant en 2011, répartis de la façon suivante : produits non transformés (22,2 kg) et produits transformés [frites et autres plats congelés (11,4 kg), croustilles (12,8 kg), et autres utilisations (conserves, etc. 10 kg)] (Agriculture, Pêcheries et Alimentation Québec).

#### 1.4. Structure du tubercule de la pomme de terre

La pomme de terre est une tige souterraine (ou stolon) hypertrophiée servant à la plante comme organe de réserve. Les tiges souterraines sont formées à partir des bourgeons latéraux naissant à la base des tiges aériennes. Elles vont naître en alternance des sous-nœuds situés sur les tiges aériennes et vont avoir une croissance diagéotropique (à l'horizontale sous la surface du sol). Le grossissement de l'extrémité distale de chaque rhizome va engendrer un tubercule. Les tubercules sont recouverts d'un périderme qui apparaît en rompant l'épiderme. Les échanges gazeux au niveau du périderme vont se faire par des lenticelles. Les lenticelles sont des orifices circulaires qui proviennent de l'expansion des cellules du périderme vers l'extérieur du tubercule (Figure 1.1).

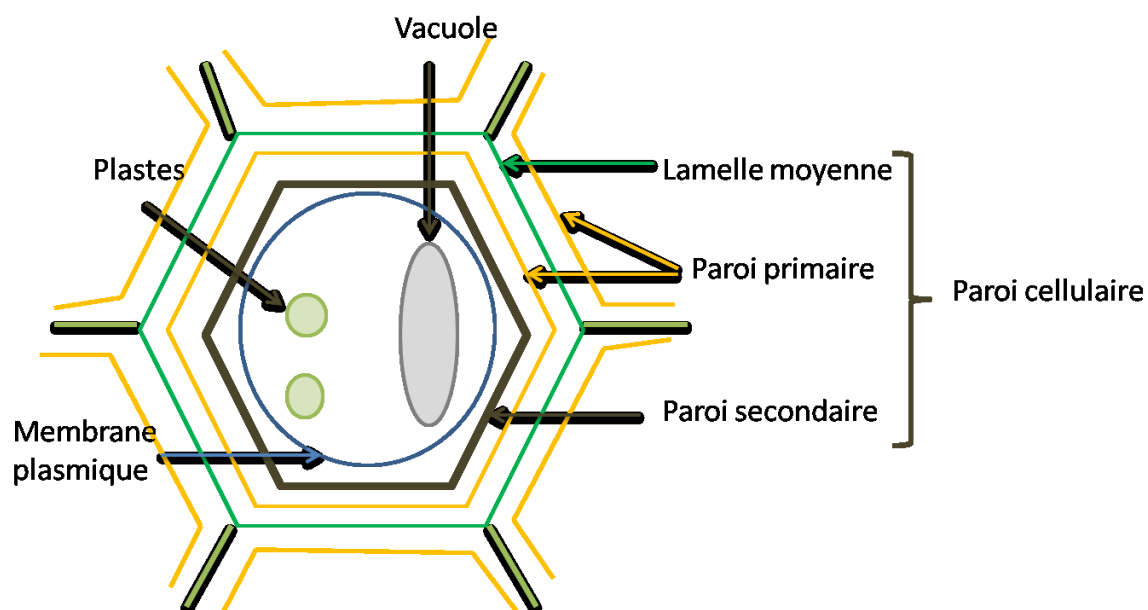


**Figure 1. 1. Représentation d'une coupe longitudinale du tubercule de pomme de terre.**

Structure du péricor et la couche de cellules subérisées (modifié de Tyner *et al.*, 1997)

#### 1.4.1. Cellule du tubercule de la pomme de terre

Comme toute cellule végétale, les cellules du tubercule de la pomme de terre ont une paroi cellulaire qui est composée de trois parties : 1) la lamelle moyenne, constituée principalement de matières pectiques, 2) la paroi primaire, de nature pectocellulosique, 3) la paroi secondaire, composée de cellulose et d'hémicellulose et pouvant être enrichie en composés phénoliques (Figure 1.2). Cependant, la cellule du tubercule de la pomme de terre diffère des autres cellules végétales, car elle a comme organite des amyloplastes à la place des chloroplastes. On retrouve les amyloplastes dans les cellules des organes de réserve. Ce sont des plastes spécialisés dans le stockage de l'amidon.



**Figure 1. 2. Representation d'une cellule végétale et de ses parois.**

#### 1.4.2. La paroi végétale.

La paroi végétale est une structure cellulaire qui protège et qui contribue à la forme de la cellule végétale. Bien que la paroi soit rigide, elle permet les échanges d'eau et de nutriments pour arriver jusqu'au plasmalemme. La structure et la composition de la paroi peuvent être différentes d'une espèce à une autre, en fonction du climat et des conditions environnementales telles que des stress osmotiques ou la sécheresse (Chen *et al.*, 2005), de la morphologie de la plante (Krupková *et al.*, 2007) ou des attaques par des micro-organismes pathogènes tels que les bactéries ou les champignons (Hernandez-Blanco *et al.*, 2007). Ainsi, la paroi végétale constitue la première barrière à franchir lorsque les agents pathogènes tentent de coloniser la plante hôte. La plupart des agents pathogènes sont capables de dégrader les polymères de cette barrière grâce à des enzymes hydrolytiques. Les enzymes de dégradation de la paroi végétale ont une importance non seulement pour la virulence d'un agent pathogène, mais aussi pour induire les réponses de défense chez la plante hôte (Walton, 1994 ; Cosgrove, 2000). La paroi végétale est

essentiellement composée de polymères glucidiques, cellulose et pectine, de protéines pariétales et éventuellement d'autres composées de nature phénolique (lignine et subérine).

Des dépôts de composés tels que la subérine ou la lignine modulent les propriétés physico-chimiques de la paroi, la rendant par exemple plus solide ou plus imperméable.

#### 1.4.2.1. Lamelle moyenne

La lamelle moyenne est une couche qui sépare deux cellules végétales voisines et qui assure en même temps la cohésion intracellulaire. Elle forme un ciment entre les cellules végétales. Elle est essentiellement composée de polysides acides, les pectines (Jarrige *et al.*, 1995). La pectine est un polyside caractérisée par un squelette d'acide  $\alpha$ -D-galacturonique avec des liens 1-4 et d' $\alpha$ -L-rhamnose avec des liens 1-2 et 1-4 ramifiés par du galactose et de l'arabinose (Ridley *et al.*, 2001). Ainsi, la cellulose et les hémicelluloses donnent la rigidité à la paroi primaire et forment le squelette de la cellule végétale, et la pectine jouerait un rôle de ciment qui relierait les fibres de cellulose et hémicellulose entre elles pour augmenter la rigidité (Cosgrove, 2000).

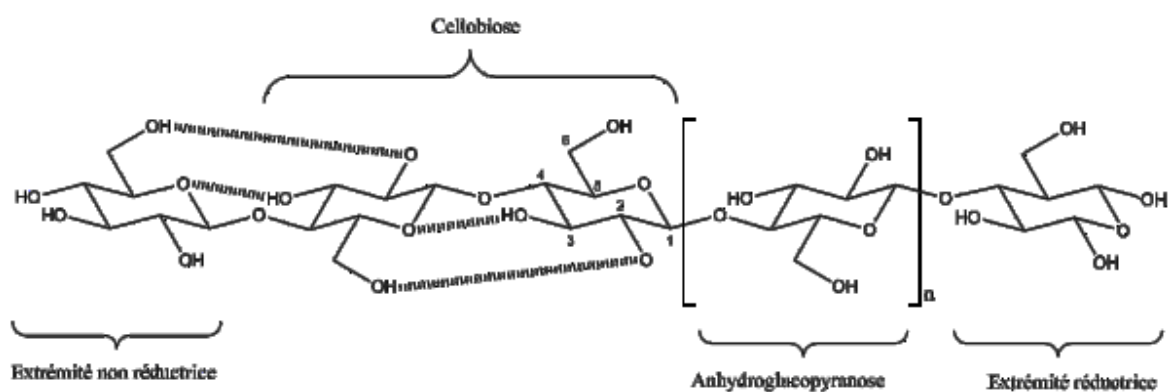
#### 1.4.2.2. La paroi primaire

Chez la pomme de terre comme chez toutes les plantes, la cellule est encerclée par une paroi cellulaire pectocellulosique qui fournit un soutien structurel. Cette paroi cellulaire pectocellulosique est composée de cellulose, d'hémicelluloses et de pectine.

La cellulose est un homopolymère linéaire composé de très nombreuses unités de  $\beta$ -1,4-D-anhydroglucopyranose (AGU) reliées entre elles par des liaisons glycosidiques  $\beta$ -(1,4). Le motif de répétition est le dimère cellobiose (Wikipedia,

Figure 1.3). L'enchainement des molécules de D-anhydroglucopyranose forme des chaînes de polymères linéaires qui ont entre 3 et 5 nanomètres de largeur et peuvent atteindre jusqu'à plusieurs micromètres de longueur (Cosgrove, 2005). Ainsi, les propriétés de la cellulose offrent une rigidité à la cellule qui va jouer le rôle de squelette.

Les macromolécules de cellulose associées forment des microfibrilles qui, elles-mêmes assemblées en couches, forment les parois des fibres végétales. Il s'établit des liaisons hydrogène entre les molécules de glucose des différentes chaînes (Wikipedia). La cellulose peut être utilisée comme source de carbone par plusieurs organismes comme des bactéries, des champignons et des protozoaires.



**Figure 1. 3. Structure de la cellulose.**

(<http://www.glucide.wikibis.com/cellulose.php>)

Les hémicelluloses constituent le deuxième composant le plus abondant de la paroi pectocellulosique chez les végétaux, le premier étant la cellulose. Elles ont un rôle de pontage entre les fibres de cellulose, mais aussi avec d'autres composés matriciels.

L'hémicellulose est un polymère branché avec différents types d'oses, tels que les hexoses, les pentoses et les oses méthylés. Au contraire de la cellulose,

l'hémicellulose ne contient pas que des glucoses anhydres. La structure des hémicelluloses est formée de résidus  $\beta$ -(1,4)-D-hexose ou pyranose. Les pyranoses peuvent être des xyloses ou des arabinoses et les hexoses peuvent être des mannoses, des galactoses et des rhamnoses. On retrouve principalement des xyloglucanes et des mannanes (Schellet et Ulvskov, 2010). L'hémicellulose est faite majoritairement de D-pentoses, parfois de petites quantités d'oses de configuration L. Le xylose est toujours l'ose le plus représenté, mais les acides mannuronique et galacturonique sont aussi souvent présents. Les hémicelluloses incluent les polyosides suivants : xylane, lichénine,  $\beta$ -D-glucane, laminarine, glucuronoxylane, arabinoxylane, glucomannane, et xyloglucane (Bacic *et al.*, 1988). Les polymères d'hémicellulose apportent du soutien et de la rigidité à la paroi primaire de même que la cellulose (Cosgrove, 2005). Les hémicelluloses principales sont des xylanes et des glucomannanes (Zhong et Ye, 2009)

#### 1.4.2.3. La paroi secondaire

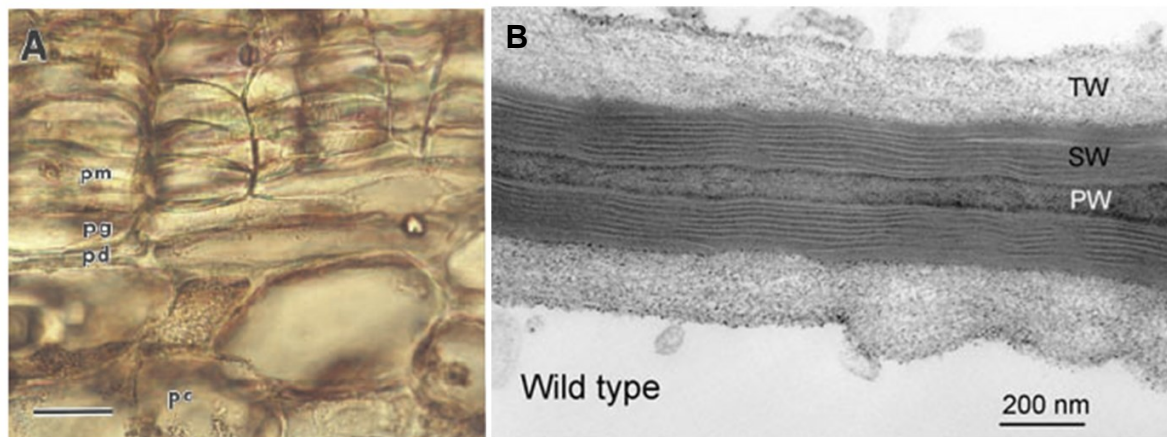
La paroi secondaire est aussi composée de cellulose et d'hémicellulose, mais on retrouve aussi de la lignine, un polymère aromatique. La lignine est présente exclusivement dans les parois secondaires (Vanholme *et al.*, 2010). La lignine est un polymère de monolignols qui peut être associé à d'autres monomères tels que l'alcool coumarylique, l'alcool coniférylique ou l'alcool sinapylique. La présence de subérine (la composition sera décrite dans la section 1.4.2.3.2) dans la paroi secondaire varie selon les plantes. Dans le cas de la pomme de terre on retrouve dans le périderme de la subérine, à la place de la lignine.

##### 1.4.2.3.1. Le périderme

Le périderme forme une barrière lipophile pour empêcher la perte d'eau. Le périderme de la pomme de terre est constitué de 3 couches de tissu : le phellème, le phellogène et le phelloderme (Reeve *et al.*, 1969). Le phellème (ou liège) forme une série de couches à la partie extérieure du périderme et il est dérivé du



phellogène, qui va former le phelloderme vers l'intérieur du tubercule (Figure 1.4A). Les cellules du phellème sont constituées d'une paroi cellulaire primaire, d'une paroi cellulaire secondaire subérisée et d'une paroi tertiaire (la couche la plus interne de la paroi secondaire) (Serra *et al.*, 2010 ; Figure 1.4B). Lorsque les cellules du phellème se développent, elles vont se subériser et mourir (car la subérine déposée dans les cellules empêche tout échange cellulaire), pour former une couche protectrice (Sabba et Lulai, 2002). Chez les plantes en général, le périoderme se trouve aussi bien dans les parties aériennes que souterraines des végétaux qui ont une croissance secondaire et ce tissu est formé d'une multitude de couches. Il y a cependant des exceptions où les couches de cellules sont limitées, c'est le cas du périoderme de la pomme (fruit) et de la pomme de terre (tubercule) (Bernards *et al.*, 2002). Chez la pomme de terre, le périoderme représente la peau ou la pelure, c'est un tissu de revêtement et protection qui contient peu de nutriments. Le périoderme est formé lorsque le bout du stolon gonfle et jusqu'à la fin de la croissance du tubercule de la pomme de terre. C'est deux ou trois semaines après la récolte que le périoderme devient mature avec une couverture lipidique complète (Neubauer *et al.*, 2013) et forme une barrière en s'attachant aux cellules du tubercule, ce qui rend le tubercule plus résistant aux blessures, aux pertes d'eau et aux dommages mécaniques (Lendzian, 2006). Ainsi le phellème est un tissu protecteur mort et la subérine qui se trouve dans ses cellules peut jouer un rôle protecteur vis-à-vis des agents pathogènes (Lulai et Corsini, 1998 ; Kolattukudy, 1984) en formant une barrière biochimique grâce aux composés phénoliques présents dans le polymère (Kolattukudy, 1984).



**Figure 1. 4. Structure du périderme de la pomme de terre**

A) Coupe transversale du périderme (pm) phellème, (pg) phellogène, (pd) pelloderme, (pc) parenchyme sous le périderme (Sabba et Lulai, 2002) B) Structure de la paroi des cellules du phellème de la pomme de terre, (TW) paroi tertiaire, (SW) paroi secondaire subérisée, (PW) paroi primaire (Serra *et al.*, 2010).

#### 1.4.2.3.2. La subérine

Le périderme possède une couche lipidique, appelée subérine, qui forme une barrière de protection contre les agents pathogènes, dont ceux causant la gale commune.

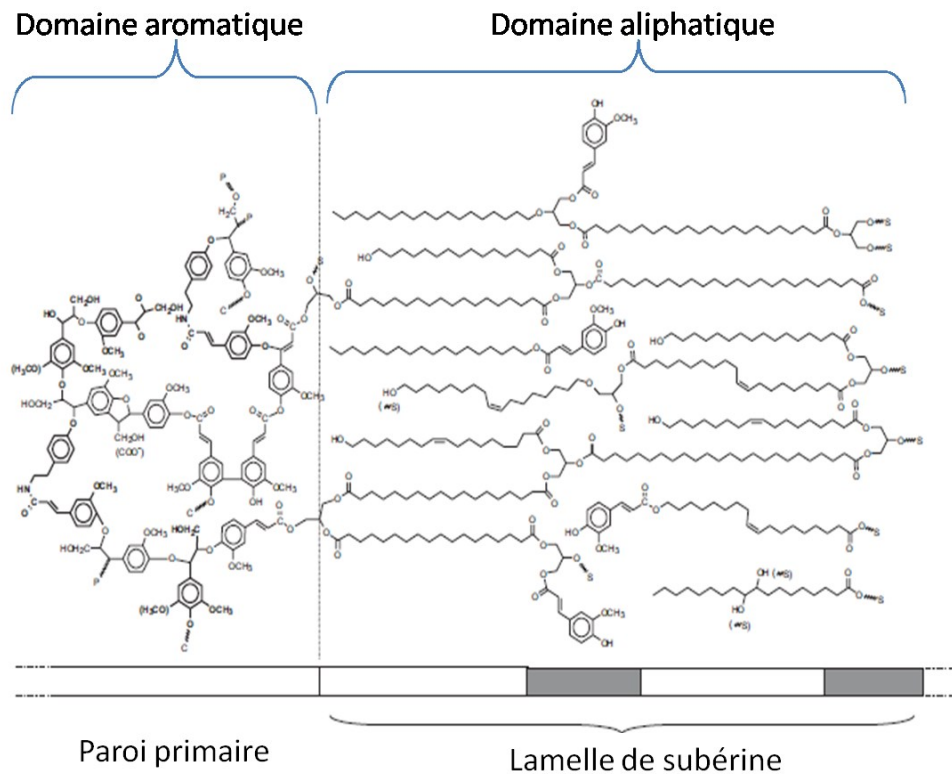
La subérine est un polymère unique aux plantes. C'est un des composés majeurs des parois cellulaires végétales se trouvant dans le liège de nombreuses espèces au niveau de la tige ou des racines primaires (Schreiber *et al.*, 1999 ; Hartmann *et al.*, 2002), dans les bandes de Caspari (Wu *et al.*, 2003), dans le tégument secondaire et les fibres du coton (Ryser *et al.*, 1983 ; Moire *et al.*, 1999), dans les faisceaux vasculaires des feuilles (Espelie *et al.*, 1980), dans les cellules endodermes et exodermes. La plante produit aussi la subérine à la suite d'un stress biotique ou environnemental (Franke *et al.*, 2012). La subérine est un

polymère riche en résidus de glycérol qui forme une barrière pour contrôler le flux de solutés (exsudats), de l'eau (pour empêcher la perte d'eau en cas de sécheresse) et de gaz, mais elle joue aussi un rôle dans la protection de la plante contre les stress abiotiques (comme isolant thermique ou contre les blessures mécaniques) et biotiques (barrière contre l'attaque des agents pathogènes) (Pollard *et al.*, 2008 ; Graça et Pereira, 2000). Ce polymère naturel est construit de deux domaines différents : un domaine aliphatique estérifié et un domaine aromatique qui sont liés de façon covalente. Le domaine aliphatique ancre la subérine à la paroi cellulaire (Stark et Garbow, 1992).

La structure du domaine aliphatique a été déterminée par la dépolymérisation de celui-ci au niveau des liens esters. Le domaine polyaliphatique riche en acides gras est estérifié avec des composés phénoliques et forme un réseau tridimensionnel lié par le glycérol. Il est localisé entre la paroi cellulaire primaire et le plasmalemma (Bernards, 2002 ; Figure 1.5). Le domaine aliphatique se compare à la cutine sauf que la cutine ne contient pas des acides gras à si longues chaînes. La portion aliphatique de la subérine est composée principalement de longues chaînes d'acides aliphatiques dicarboxyliques (entre 16 et 24 atomes de carbone), d'acides gras  $\omega$ -hydroxy (entre 20 et 30 atomes de carbone), de longs acides gras (jusqu'à 30 atomes de carbone), d'alcools gras et de glycérols (Bernards, 2002 ; Gandini *et al.*, 2006). Cependant, la quantité finale d'acides  $\omega$ -hydroxy et de glycérol est variable et dépend du tissu et de l'espèce végétale (Graça et Santos, 2007). La nature lamellaire des parois cellulaires subérisées correspond probablement aux molécules aliphatiques estérifiées avec une mobilité moléculaire basse, empilées de façon relativement ordonnée, qui alternent avec des couches riches en coumarates estérifiés au glycérol qui montrent une mobilité moléculaire beaucoup plus haute (Bernards, 2002 ; Lopes *et al.*, 2000).

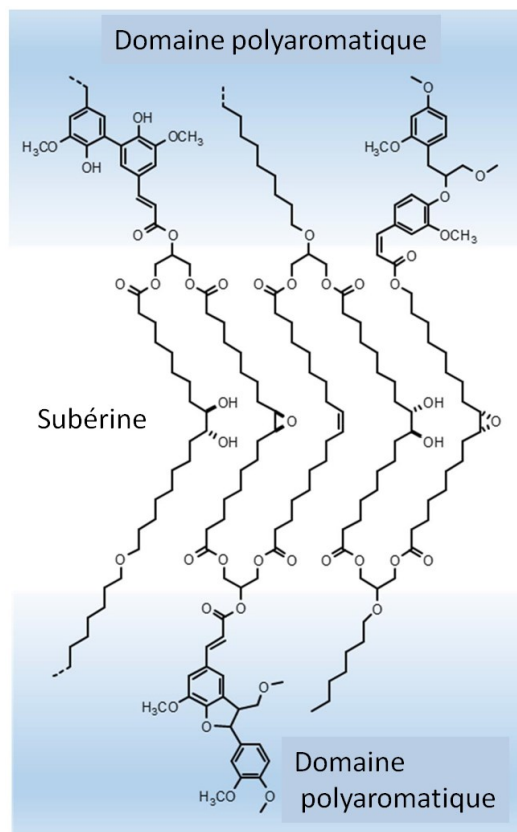
Le domaine polyaromatique est ancré dans la paroi cellulaire primaire et est riche en acides hydrocinnamiques. La partie polyaromatique s'apparente à la structure

chimique de la lignine (Kolattukurdy, 1980 ; Bernards, 2002). La nature des domaines aromatiques de la subérine est beaucoup plus complexe que celle des parties aliphatiques. Cette structure est attachée de façon covalente à la subérine aliphatique, par des liens éther ou ester (Bernards and Razem, 2001). (Figure 1.5).



**Figure 1. 5. Structure hypothétique de la subérine (modifiée de Bernards, 2002).**

Un étude récente (Graça *et al.*, 2015) propose le modèle suivant de la subérine : un polymère constitué de glycérol - $\alpha,\omega$ -diacide –glycérol au cœur de la partie continue du domaine polyaliphatique et du glycérol - $\omega$ -acide hydroxy –acide férulique, ancrant le domaine polyaliphatique au domaine polyaromatique grâce à un lien avec l'acide férulique (Figure 1.6).

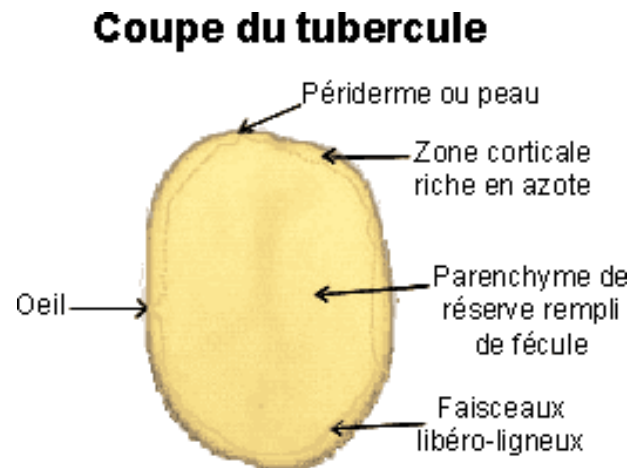


**Figure 1. 6. Structure hypothétique de la subérine (modifiée de Graça, 2015).**

#### 1.4.3. Le parenchyme

Le parenchyme (Figure 1.7) est un tissu végétal constitué de cellules vivantes à paroi pectocellulosique mince. Ce sont essentiellement des cellules de remplissage peu différenciées. Les cellules sont jointives et collent au niveau de la lamelle moyenne. Cependant, des décollements au niveau des angles forment un parenchyme à méats ou si les espacements sont plus importants c'est donc un parenchyme lacuneux. Le parenchyme du tubercule de la pomme de terre est un parenchyme de réserve qui va accumuler des substances énergétiques que la plante pourra utiliser plus tard. Dans ce cas, les plastes vont accumuler de l'amidon (ou féculé), les vacuoles vont accumuler des oses, osides et protéines et le cytoplasme va accumuler des lipides. Le parenchyme médullaire renferme de gros

grains d'amidon tandis que le parenchyme cortical a une forte concentration en petits grains d'amidon (Rouselle *et al.*, 1996, Figure 1.7)



**Figure 1. 7. Coupe transversale du tubercule de la pomme de terre.**

(<http://www.hortiantoing.net/avrilpdt.html>)

#### 1.4.4. Les faisceaux vasculaires

Les cellules des faisceaux vasculaires (Figure 1.7) contiennent plusieurs petits grains d'amidon d'un diamètre entre 6 et 10  $\mu\text{m}$ . Les faisceaux vasculaires se situent près de la zone médullaire, cependant, ils ne sont pas volumineux, car c'est plutôt la moelle qui va se développer et stocker des grains d'amidon.

### 1.5. Maladies de la pomme de terre

#### 1.5.1. Les plus communes

La pomme de terre peut être la cible de différents agents pathogènes, tels que les champignons, bactéries, virus, mycoplasmes et nématodes (Hooker, W.J. 1981). Le mildiou de la pomme de terre causée par le champignon *Phytophthora infestans* est la maladie la plus importante au niveau mondial, suivi de la pourriture brune, causée par la bactérie *Ralstonia solanacearum*. Cependant d'autres maladies telles que la rhizoctonie causée par le champignon *Rhizoctonia solani*, la dartrose causée par le champignon *Colletotrichum coccodes*, la gangrène de la pomme de terre causée par le champignon *Phoma exigua*, la fusariose causée par les champignons *Fusarium roseum* et *Fusarium solani*, la gale argentée causée par le champignon *Helminthosporium solani*, la gale poudreuse causée par le protozoaire *Spongospora subterranea*, la gale verruqueuse causée par le champignon *Synchytrium endobioticum* et la gale commune causée par différentes espèces de streptomycètes, dont *Streptomyces scabiei* entraînent des pertes économiques variables.

Mes recherches se sont focalisées sur les agents phytopathogènes qui provoquent la gale commune de la pomme de terre, et principalement *S. scabiei*.

#### 1.5.2 La gale commune de la pomme de terre

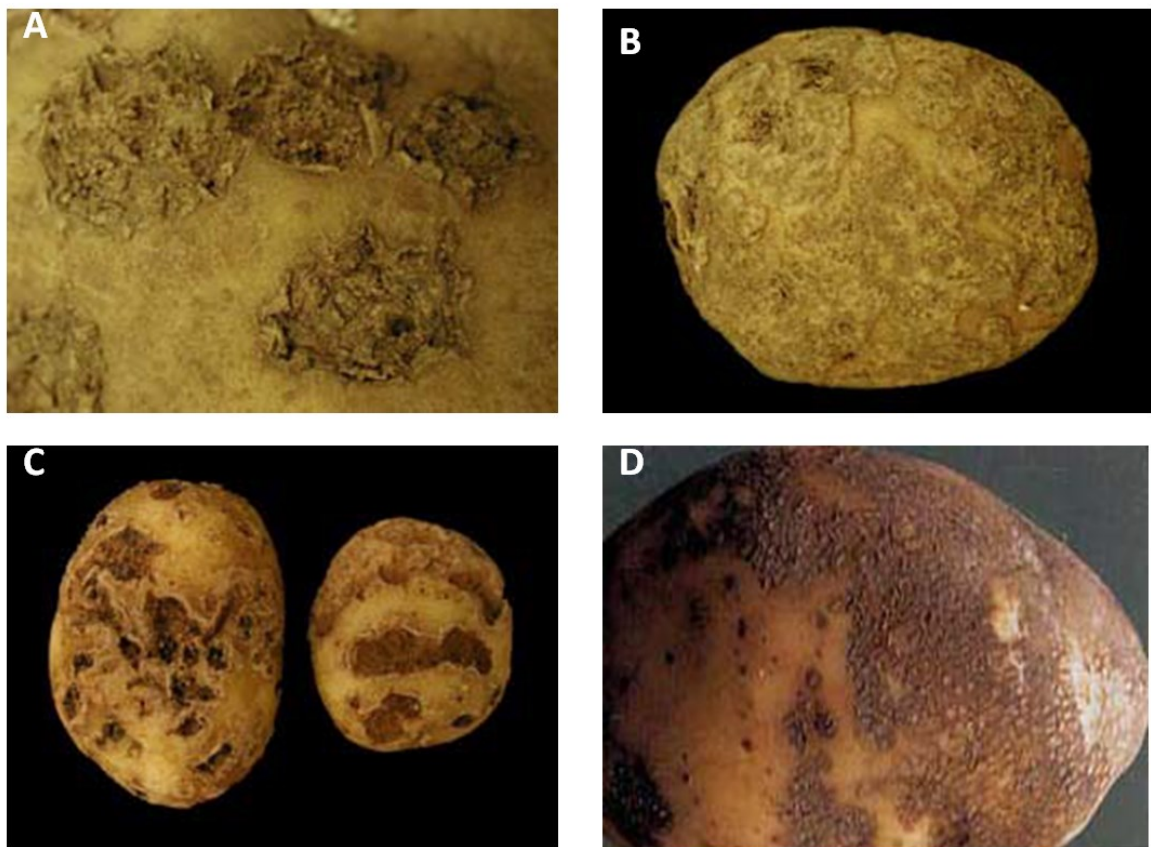
La gale commune de la pomme de terre est une maladie importante causée principalement par la bactérie *Streptomyces scabiei*. La maladie peut toucher également d'autres cultures comme la betterave (*Beta vulgaris* L.), le panais (*Pastinaca sativa* L. subsp. *sativa*), le rutabaga (*Brassica napus* L. var. *napobrassica* L.), le navet (*Brassica rapa* L.), la carotte (*Daucus carota* L.) et le radis (*Raphanus sativus* L.) (Goyer et Beaulieu, 1997), mais aussi la gousse d'arachide (*Arachis hypogaea* L.) (de Klerk *et al.*, 1997). Les lésions caractéristiques de la maladie sont visibles à la surface des gousses, des racines pivotantes ou des tubercules. Les symptômes peuvent apparaître comme des lésions profondes ou superficielles, de type liégeux (Goyer *et al.*, 1996). Généralement, la gale commune

de la pomme de terre n'affecte pas le rendement de la culture. La consommation des pommes de terre infectées par *S. scabiei* n'est pas dangereuse pour l'humain. Cependant, la commercialisation des tubercules comme la pomme de terre, dépend de leur apparence générale. Ainsi, le degré d'infection de la pomme de terre affecte directement sa valeur marchande. Les industries alimentaires qui vont transformer la pomme de terre en croustilles ou frites, n'achètent pas des pommes de terre ayant des lésions de la gale commune de la pomme de terre. En effet, lors de la friture de la pomme de terre, les lésions vont se carboniser et l'aspect de la frite ou de la croustille ne sera pas alléchante à la consommation. L'incidence de la gale commune de la pomme de terre sur des tubercules génère des pertes économiques d'environ 15 % au Québec (Hill et Lazarovits, 2005).

Il existe plusieurs stades de la maladie selon Dallaire (2007, Figure 1.8) :

- A) Gale superficielle : On retrouve les symptômes de la maladie uniquement à la surface avec mort cellulaire de la couche supérieure du périderme. Ce sont des lésions liégeuses et superficielles.
- B) Gale bosselée ou en saillie : Du tissu cicatriciel se reforme autour des lésions et forme des bosses et des cratères. Ce sont des lésions éruptives.
- C) Gale profonde : On retrouve des lésions profondes qui peuvent mesurer jusqu'à 6 mm. Ce sont des lésions sillonnées et brun foncé.
- D) Gale réticulée : On retrouve des lésions qui forment un quadrillage en filet en superficie.





**Figure 1. 8. Différents degrés d'atteinte de la gale commune de la pomme de terre (Dallaire, 2007).**

A) Gale superficielle, B) Gale bosselée, C) Gale profonde, D) Gale réticulée.

Des espèces de streptomycètes autres que *S. scabiei* ont été isolées de pommes de terre qui montraient les mêmes symptômes que ceux de la gale commune de la pomme de terre, tels que *S. turgidiscabies* et *S. acidiscabies*. Cependant, les autres streptomycètes pathogènes ont une distribution géographique plus restreinte, tandis que *S. scabies* est ubiquitaire. Les conditions optimales pour le développement de la maladie sont un pH entre 5,2 et 7,0 et une température comprise entre 20 et 22°C dans un sol peu humide (Wharton et al., 2007).

### 1.6. Le genre *Streptomyces*

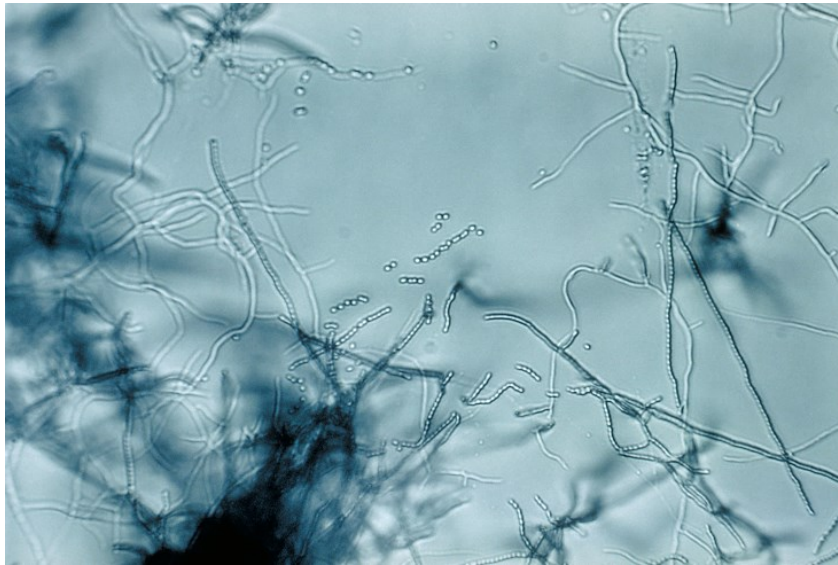
Le genre *Streptomyces* appartient à l'ordre des Actinobactéries. Ce sont des bactéries à Gram-positif pour la plupart saprophytes, retrouvées en abondance dans le sol, strictement aérobies, qui forment des hyphes aériens sporogènes (Figure 1.9) (Lloyd, 1969 ; Stackebrandt *et al.*, 1997). L'habitat des streptomycètes, c'est-à-dire le sol, requiert qu'elles développent des spores résistantes à la dessiccation. Lorsque les conditions redeviennent favorables, ces spores germent et se développent en hyphes filamenteux ramifiés. Ce type de croissance aide à adhérer et à pénétrer la matière organique insoluble qui est ensuite désagrégée par des exoenzymes hydrolytiques pour apporter des nutriments à la bactérie pour sa croissance. Lors de la croissance, les colonies forment un paquet dense de mycélium, duquel des hyphes aériens émergent, formant éventuellement de nouvelles spores (Flärdh et Buttner, 2009). La croissance aérienne est obtenue aux dépens de la biomasse mycéliale, qui est intensivement lysée et fournit l'énergie nécessaire à la différenciation (Miguélez *et al.*, 1999). La production d'antibiotiques et des métabolites secondaires est associée à ce stade du cycle cellulaire.

Les actinobactéries sont responsables de la production d'environ 70% des antibiotiques découverts à ce jour (Berdy, 2005). Les *Streptomyces* produisent une large gamme de métabolites secondaires qui peuvent agir comme des inhibiteurs chimiques de plusieurs processus cellulaires. Ils produisent des antibiotiques, des fongicides, des composés cytostatiques, des modulateurs des mécanismes de défense et des effecteurs de croissance des plantes (Hopwood *et al.*, 2007a et b; Lerat *et al.*, 2009, Fayad *et al.*, 2001 ; Clermont *et al.*, 2010).

Les *Streptomyces* sont connus pour leur grande variété de métabolites extracellulaires qui sont nécessaires non seulement pour la production d'antibiotiques, mais aussi pour leur croissance primaire, pour faciliter l'association avec d'autres organismes, ainsi que pour effectuer les étapes complexes de leur

développement (Chater *et al.*, 2010). Les enzymes hydrolytiques extracellulaires (Hodgson, 2000) qu'ils produisent leur servent à décomposer la matière organique telles la lignine et la cellulose (Crawford et Crawford, 1980) pour éventuellement former de l'humus. Ils jouent ainsi un rôle important dans la décomposition et la minéralisation des matières organiques grâce à la production d'enzymes extracellulaires. Leur habileté à utiliser des protéines qui lient des substrats non-catalytiques et des enzymes hydrolytiques afin d'obtenir des nutriments solubles à partir des hydrates de carbone comme la chitine et la cellulose leur permet de coloniser le sol (Chater *et al.*, 2010). En plus de leur participation active dans la décomposition de la matière organique, les actinobactéries jouent d'autres rôles importants au niveau de la rhizosphère.

Les génomes des *Streptomyces* sont linéaires (Lin *et al.*, 1993 ; Yang *et al.*, 2002 ; Bao et Cohen, 2003) et ont une proportion de bases G et C très élevée (environ 72%) ce qui rend les chromosomes très stables à haute température (Pranta et Jorgensen, 1991). De plus, ayant des chromosomes de très grande taille (environ 8,7 Mb), leur région centrale comporte des gènes essentiels tels que les gènes des fonctions métaboliques et pour les espèces pathogènes, les gènes impliqués dans le pouvoir pathogène (Loria *et al.*, 2006). L'association des actinobactéries aux organes souterrains des plantes peut être délétère ou bénéfique. Les effets bénéfiques peuvent être dus à l'induction des mécanismes immunitaires des plantes (Lerat *et al.*, 2009), la production de phytohormones (Sreevidya *et al.*, 2016) ou la fixation de l'azote atmosphérique (Benson et Silvester, 1993), alors que les effets néfastes sont provoqués par la production de toxines (Locci, 1994).



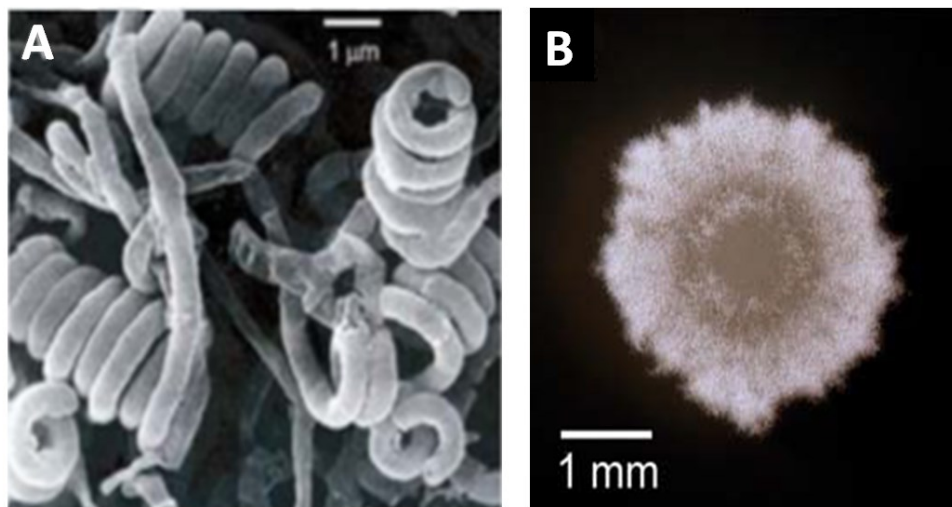
**Figure 1. 9. Morphologie classique des hyphes et des spores de *Streptomyces*.**

(Wikipédia :[https://fr.wikipedia.org/wiki/Streptomyces#/media/File:Streptomyces\\_sp\\_01.png](https://fr.wikipedia.org/wiki/Streptomyces#/media/File:Streptomyces_sp_01.png))

#### 1.6.1. *Streptomyces scabiei*

C'est en 1890 que Thaxter a isolé pour la première fois l'agent responsable de la gale commune et il lui a donné le nom d'*Oospora scabies* (Thaxter, 1891). En 1914, Güssow change le nom de la bactérie pour *Actinomyces scabies*. C'est finalement en 1943 que Waskman et Henrici donnent le nom définitif à la bactérie, *Streptomyces scabiei* (syn. *S. scabies*). Lambert et Loria (1989b) ont redéfini la position taxonomique de *S. scabiei* et ont proposé la souche ATCC49173 comme un néotype. Les caractéristiques de *S. scabiei* sont la production de mélanine et des spores lisses, grises, organisées en chaînes spiralées. Ces chaînes spiralées sont des filaments mycéliens d'environ 1 µm de diamètre (Figure 1.10A). Le mycélium responsable de la colonisation du milieu solide n'est pas cloisonné en phase de croissance (stade végétatif). C'est dans la deuxième phase de croissance, la phase aérienne, que les hyphes vont croître à l'extérieur du substrat, se

cloisonner, et vont donner aux colonies un aspect cotonneux grisâtre (Figure 1.10B). Lors de la ramification des hyphes (conidiophores), des spores (ou conidies) vont se former. Elles mesurent entre 0,5 et 1  $\mu\text{m}$ . Le cloisonnement des hyphes se fait de l'extrémité vers la base. Lorsque le cloisonnement est fini, les spores vont finir par se détacher des hyphes. Lors de la germination des conidies, des tubes germinatifs vont donner naissance à la forme mycéloïde. En milieu liquide et sans agitation, les hyphes vont monter en surface pour être au contact avec l'air (van Keulen *et al.*, 2003). En ajoutant de l'agitation au milieu liquide, il y a formation des hyphes agrégés et des hyphes dispersés. Les hyphes dispersés sont des hyphes qui vont rester libres dans le milieu de culture et au cours de l'agitation les hyphes vont s'enchevêtrer et former des agrégats denses et sphériques de mycélium mesurant quelques millimètres de diamètre (Drouin *et al.*, 1997 ; Papagianni, 2004). L'agrégat d'hyphes peut diminuer la disponibilité d'oxygène et nutriments pour les bactéries au cœur de la sphère (Papagianni, 2004), ce qui est un facteur limitant pour la croissance de *S. scabiei*, car c'est une bactérie aérobie. La croissance de la bactérie est inhibée sur milieu solide lorsque le pH est inférieur à 5 et elle est sensible à l'antibiotique streptomycine (Lambert et Loria, 1989a).



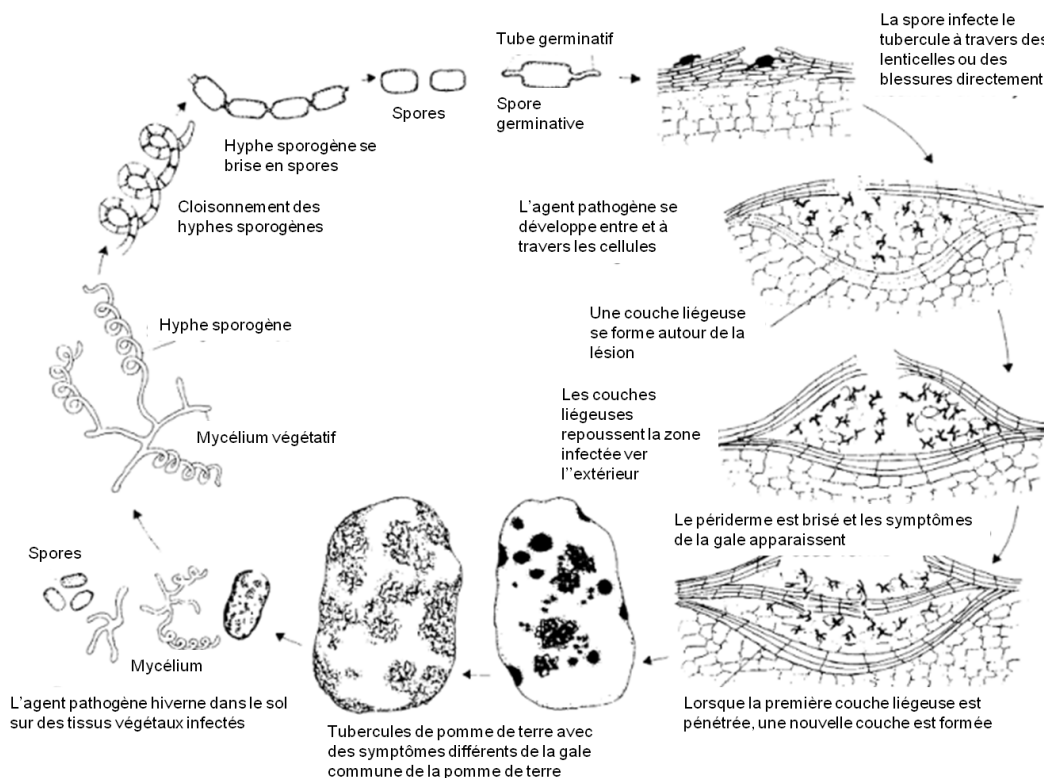
**Figure 1. 10. Morphologie de *Streptomyces scabiei* souche EF-35.**

A) Mycélium aérien (Lerat *et al.*, 2009). B) Colonie en milieu solide (Lerat *et al.*, 2010).

#### 1.6.2. Cycle de vie de *S. scabiei*

*S. scabiei* peut rester en dormance tout l'hiver dans le sol, mais aussi sur les végétaux en décomposition et sur les racines de plantes (Agrios, 2005). C'est au printemps que la bactérie sort de sa dormance. La germination des spores et leur dispersion est favorisée par la machinerie agricole, le vent, la pluie ou par des semences infectées. La bactérie pénètre son hôte par les lenticelles ou les blessures pendant les premiers jours de croissance du tubercule (Adams et Lapwood, 1978). Il a aussi été rapporté que *S. scabiei* peut pénétrer de façon directe la pomme de terre (Loria *et al.*, 2003). La croissance du mycélium est d'abord intercellulaire, mais devient ensuite intracellulaire. Pour empêcher la propagation du mycélium de *S. scabiei* vers l'intérieur du tubercule, les cellules végétales entourant le foyer d'infection se divisent et se différencient pour former une ou plusieurs couches subérisées de périderme (Babcock *et al.*, 1993). C'est pendant la colonisation du périderme que la bactérie va sécréter sa large gamme de

métabolites secondaires tels que des enzymes hydrolytiques et des toxines, ce qui va provoquer la dégradation des cellules du périoderme. C'est cette succession de couches de périoderme formées lors de l'avancée de l'agent pathogène dans les tissus végétaux qui provoque les lésions caractéristiques de la gale commune (Figure 1.11).



**Figure 1. 11. Cycle de la maladie de la gale commune de la pomme de terre causée par *S. scabiei*. (Adapté d'Agrios, 2005).**

### 1.6.3. Le pouvoir pathogène

#### 1.6.3.1. La production des toxines

Les toxines sont des substances toxiques élaborées par la bactérie et qui lui confèrent son pouvoir pathogène. Les bactéries phytopathogènes produisent en

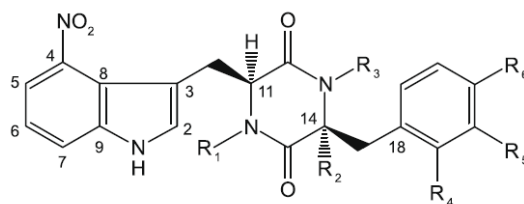
général deux types de toxines, les endotoxines situées dans la membrane externe des bactéries à Gram-négatif (des lipopolysaccharides) et les exotoxines (molécules extracellulaires sécrétées). La bactérie *S. scabiei* produit des exotoxines.

#### 1.6.3.1.1. Les thaxtomines

Les thaxtomines sont essentielles à la virulence des *Streptomyces* pathogènes (Goyer *et al.*, 1998) causant la gale commune. Des souches, dont la voie de biosynthèse de la thaxtomine a été mutée, deviennent non pathogènes (Healy *et al.*, 1997 ; Goyer *et al.*, 1998 ; Healy *et al.*, 2000 ; Kers *et al.*, 2004 ; Joshi *et al.*, 2007b). Ainsi, la thaxtomine est nécessaire pour le développement de la maladie (Healy *et al.*, 2000) et si appliquée sur des tissus végétaux, elle va produire des nécroses s'apparentant aux symptômes observés au niveau du tubercule de la pomme de terre (Lawrence *et al.*, 1990).

Les thaxtomines sont des dipeptides cycliques (2,5-diketopiperazines) dérivés des acides aminés L-phénylalanine et L-tryptophane, contenant un résidu 4-nitroindole. Onze composés de thaxtomine ont été caractérisés et isolés (Figure 1.12, King et Calhoun, 2009). Ces composés se différencient par la présence ou l'absence du résidu N-méthyl ou hydroxyles sur la structure de base. Lorsque le résidu 4-nitro est soit, éliminé, ou déplacé vers les positions 5, 6 ou 7 du noyau indole; ou si la chaîne latérale phénylée est remplacée; ou encore si le composé passe de la configuration D,L au lieu d'une configuration L,L: il y a une perte totale de la toxicité du composé (King *et al.*, 1992).





Compound	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>
1	Me	OH	Me	H	OH	H
2	Me	OH	Me	OH	H	H
3	Me	H	H	H	H	H
4	Me	OH	Me	H	H	H
5	Me	H	Me	H	H	H
6	Me	OH	H	H	H	H
7	Me	OH	Me	H	H	OH
8	Me	OH	Me	H	OH	OH
9	Me	OH	H	H	OH	H
10	H	OH	Me	H	OH	H
11	H	H	H	H	H	H

**Figure 1. 12. Formules structurales des thaxtomines.**

La première représentation est celle de la thaxtomine A, la deuxième représentation est celle de la thaxtomine B, et la troisième représentation est celle de la thaxtomine C (King et Calhoun, 2009)

La thaxtomine A est la principale phytotoxine produite par les *Streptomyces* pathogènes responsables de la gale commune de la pomme de terre (Healy *et al.*, 2000). Un autre *Streptomyces* phytopathogène, *S. ipomoea*, responsable de la pourriture de la patate douce, produit quant à lui principalement la thaxtomine C (King *et al.*, 1994) qui est aussi importante dans le pouvoir pathogène de cette espèce. Les thaxtomines sont des métabolites secondaires jaunâtres sécrétés pendant la transition de la phase végétative à la phase stationnaire (Babcock *et al.*, 1993). La thaxtomine induit des changements phénotypiques chez la plante hôte, tels que de l'hypertrophie cellulaire (Fry et Loria, 2002), le retard de croissance de la racine et de la plantule (Leiner *et al.*, 1996), la nécrose du tissu, l'inhibition de synthèse de la cellulose (Scheible *et al.*, 2003), l'altération dans l'influx de Ca<sup>2+</sup> (Errakhi *et al.*, 2008) et d'ions H<sup>+</sup> (Tegg *et al.*, 2005) dans les cellules végétales, la mort cellulaire programmé (Duval *et al.*, 2005 ; Meimoun *et al.*, 2009) et la

biosynthèse des phytoalexines, dont la scopoletine (Lerat *et al.*, 2009). La thaxtomine A réduit la quantité de cellulose cristalline dans la paroi cellulaire et affecte l'expression des gènes liés à la synthèse de la paroi cellulaire chez *Arabidopsis* (Bischoff *et al.*, 2009).

#### 1.6.3.1.1.1. Synthèse de la thaxtomine

Les conditions qui déclenchent la synthèse de thaxtomine par *Streptomyces scabiei* sont en cours d'élucidation. Les gènes nécessaires pour synthétiser la phytotoxine sont présents sur le locus (*txt*) sur le chromosome des espèces pathogènes (Figure 1.13, Loria *et al.*, 2008). Deux peptides synthétases non ribosomales, TxtA et TxtB, sont nécessaires pour former le groupement dicétopiperazine cyclique à partir des acides aminés phénylalanine et tryptophane (Healy *et al.*, 2000 ; King et Calhoun, 2009). L'oxyde nitrique synthétase, TxtD/NOS, va être responsable de la nitration du groupe indole du L-tryptophane (Kers *et al.*, 2004 ; Johnson *et al.*, 2009). Le gène *txtD* code pour un oxyde nitrique synthétase (NOS) qui transforme le L-arginine en oxyde nitrique (Figure 1.14). La délétion du gène *txtD* chez *S. turgidiscabies* fait diminuer drastiquement la production de thaxtomine A (Barry *et al.*, 2012). De plus, une autre enzyme semble être impliquée dans la réaction de nitration, le cytochrome P450 monooxygénase, codée par le gène *txtE* (Bignell *et al.*, 2010). À la suite de la cyclisation, il y a hydroxylation du composé par le cytochrome P450 monooxygénase, TxtC (Healy *et al.*, 2002 ; Bignell *et al.*, 2010). L'analyse du cluster lié à la biosynthèse de la thaxtomine a révélé chez *S. acidiscabies* la présence d'un cadre de lecture ouvert appelé ORFX localisé en aval du gène *txtB* (Healy *et al.*, 2002) et conservé chez *S. turgidiscabies* et *S. scabiei*. Le gène *txtB* code pour une protéine appartenant à la superfamille des MbtH (Bignell *et al.*, 2010). Les protéines appartenant à cette famille sont de petites protéines d'environ 70 acides aminés souvent associées aux groupes des gènes de biosynthèse de peptides antibiotiques non-ribosomaux et des sidérophores. Bien que la fonction de ces gènes reste inconnue, les analyses transcriptomiques chez

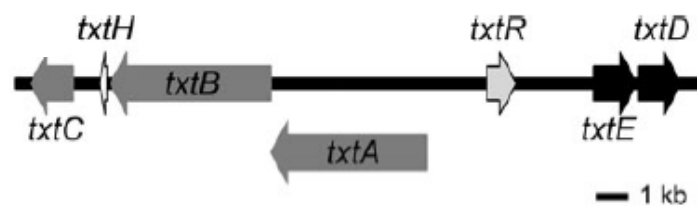
*S. scabiei*, indiquent que l'expression du gène *mbtH* est dépendante de la protéine TxtR, (le régulateur de la biosynthèse de la thaxtomine) et qu'ils sont transcrits dans des conditions où la production de thaxtomine est induite (Joshi *et al.*, 2007b). Le gène *txtH* est exprimé dans des conditions où la thaxtomine est induite et son expression est sous contrôle du gène *txtR* (Bignell *et al.*, 2010).

#### 1.6.3.1.1.2. Les possibles inducteurs de la synthèse de la thaxtomine

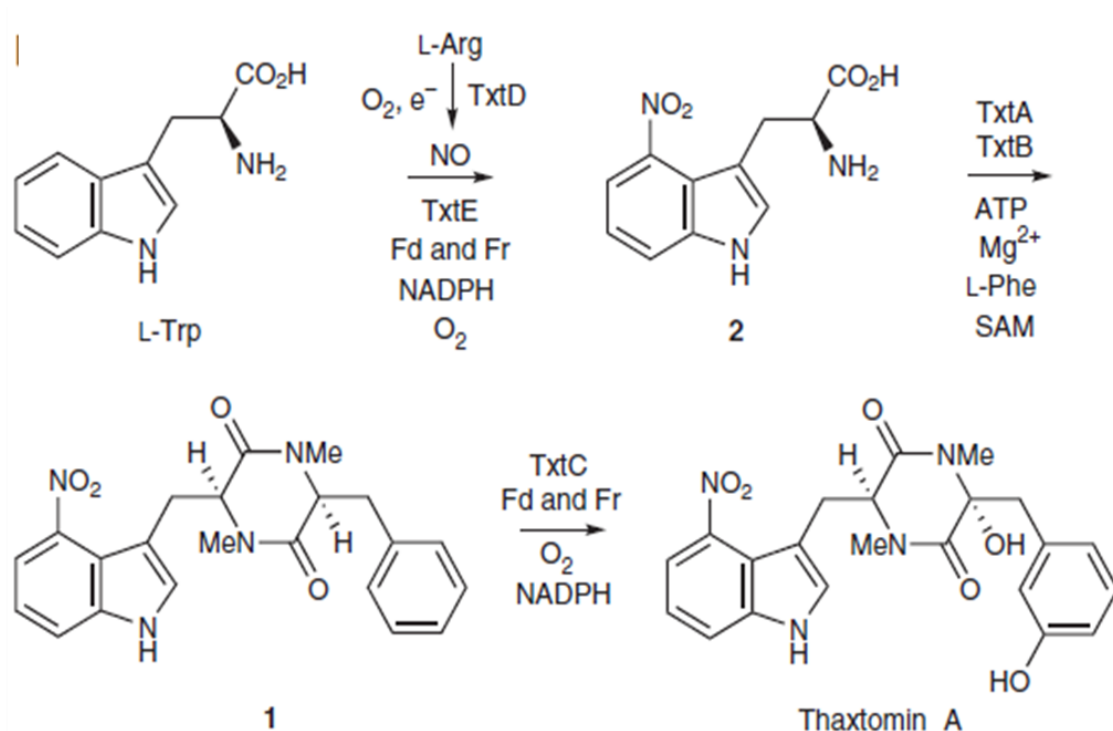
Lors d'expériences réalisées par l'équipe de Loria, le cellobiose a été identifiée comme un inducteur de la synthèse de thaxtomine A chez *S. scabiei* (Johnson *et al.*, 2007). Cependant, lorsque la bactérie est mise en présence de cellobiose comme seule source de carbone, il y a une faible induction de l'expression des gènes *txt*. De même, l'ajout de subérine dans le milieu minimum induit une faible production de thaxtomine (Beauséjour *et al.*, 1999). Par contre, lorsqu'on combine la subérine et le cellobiose dans le milieu de culture, la synthèse de thaxtomine A augmente considérablement. L'ajout de 0,5% de cellobiose et 0,1% de subérine dans le milieu de culture fait passer la production de thaxtomine A de 0,02 µg mg de bactérie<sup>-1</sup> en moyenne jusqu'à 2,08 µg mg de bactéries<sup>-1</sup> (Lerat *et al.*, 2010). Ceci suggère que *S. scabiei* a besoin de ces deux molécules pour augmenter sa pathogénicité. Ainsi contrairement à ce qui était avancé (Spooner et Hammerschmidt, 1989), il se pourrait que la capacité de *S. scabiei* à produire des glycosyl hydrolases, dont des cellulases, soit corrélée avec la pathogénicité de la bactérie, car étroitement liée à la dégradation de cellulose en cellobiose.

Une étude récente a mis en évidence des sites de liaison du répresseur d'utilisation de la cellulose (CebR) dans le groupe de gènes de synthèse de la thaxtomine (Francis *et al.*, 2015). Cependant, CebR est impliqué dans le métabolisme primaire et des fonctions nutritionnelles des *Streptomyces* non pathogènes. Chez *S. scabiei* le cellobiose et le cellotriose inhibent la capacité de CebR à se lier à l'ADN. Ceci augmente l'expression des gènes de biosynthèse et de régulation de la thaxtomine ;

*txtA*, *txtB* et *txtR* (Francis *et al.*, 2015). La délétion du gène *cebR* entraîne une production constitutive de la thaxtamine A et donc une hypervirulence de *S. scabiei* (Francis *et al.*, 2015). Ainsi, la pathogénicité de *S. scabiei* est sous double contrôle, sous le contrôle de CebR et de la protéine TxtR. CebR, est le senseur de cellobiose, la clé pour bloquer l'expression du gène *txtR*. D'autre part, le gène *txtR* est la clé nécessaire pour débloquent la production de la phytotoxine (Francis *et al.*, 2015).



**Figure 1. 13. Organisation du groupe de gènes responsables de la biosynthèse de la thaxtamine chez *S. scabiei* souche 87.22 (Bignell *et al.*, 2010).**



**Figure 1. 14. Voie de synthèse hypothétique de la thaxtomine A (Barry *et al.*, 2012).**

1.6.3.1.2. Les concanamycines

*S. scabiei* produit un autre type de toxines appelée concanamycines (Natsume *et al.*, 2005). Il s'agit de plecomacrolides qui appartiennent à la famille des antibiotiques macrolides (Natsume *et al.*, 1996). Les concanamycines sont produites non seulement par des espèces de *Streptomyces* pathogènes, tel que *S. scabiei* et *S. acidiscabies* (Natsume *et al.*, 2001), mais aussi par des espèces non pathogènes comme *S. diastatochromogenes* (Kinashi *et al.*, 1984). Leur mode d'action implique l'inhibition de certaines ATPases du système vacuolaire (Dröse, 1993 ; Huss et Wieczorek, 2009), mais le rôle que jouent les concanamycines dans l'interaction plante – agent pathogène, reste encore inconnu.

1.6.3.1.3. La coronatine

Certains gènes du génome de *S. scabiei* montrent une homologie avec des gènes responsables de la synthèse de l'acide coronafacique (CFA) chez l'agent phytopathogène *Pseudomonas syringae* (Bignell *et al.*, 2010). Cependant, ces gènes ne sont pas présents chez d'autres espèces pathogènes telles que *S. turgidiscabies*, *S. acidiscabies* et *S. europaeiscabiei* (Bignell *et al.*, 2010). La phytotoxine coronatine est un facteur de virulence important chez des pathovars de *P. syringae*. Cette phytotoxine a comme composant l'acide coronafacique lié par une liaison amide au groupement amino de l'acide coronamique (CMA). Le génome de *S. scabiei* 87-22 comporte un groupe de gènes impliqués dans la biosynthèse de métabolites secondaires, qui présente une homologie avec les gènes de l'acide coronafacique (Bender *et al.*, 1999). Cette phytotoxine a une action similaire à des dérivés du jasmonate (Katsir *et al.*, 2008a et 2008b ; Melotto *et al.*, 2008), des

molécules de signalisation indispensables pour l'immunité des plantes (Katsir *et al.*, 2008a et 2008b). La coronatine, donne un avantage aux agents phytopathogènes, car elle va supprimer les réactions de défense des plantes et donc augmenter l'infection (Bender *et al.*, 1999). Ainsi, bien qu'important pour supprimer les défenses des plantes, il n'est pas essentiel au pouvoir pathogène de *S. scabiei* et pour le développement de la maladie de la gale commune (Goyer *et al.*, 1998 ; Bignell *et al.*, 2014 ; Fyans *et al.*, 2015).

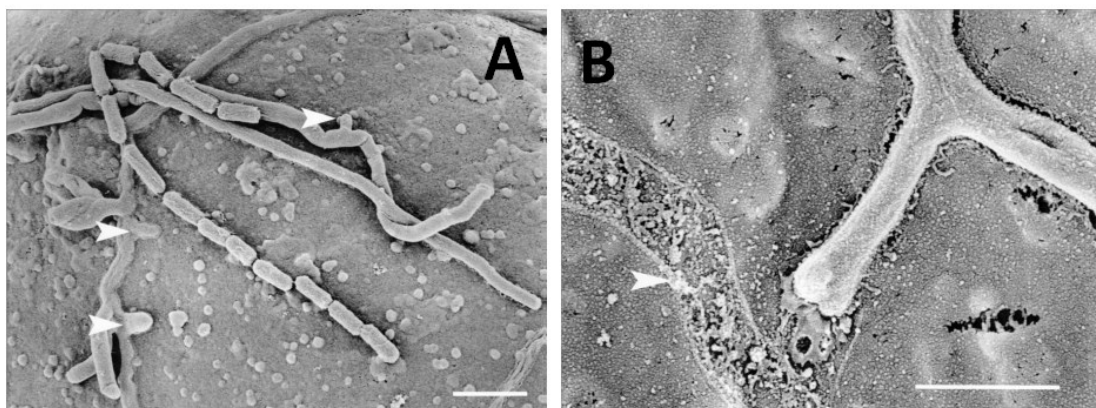
Récemment, il a été démontré que *S. scabiei* synthétise des métabolites secondaires phytotoxiques appelés coronafacoyles (aussi appelés phytotoxines semblables à la coronatine). La molécule est composée du polycétide, acide coronafacique (CFA), lié par une liaison amide à différents acides aminés ou dérivés d'acides aminés (Bender *et al.*, 1999 ; Fyans *et al.*, 2015). La principale phytotoxine coronafacoylé synthétisée par *S. scabiei* est la coronafacoylé-L-isoleucine (CFA-Ile) qui est semblable à la coronatine, mais moins toxique (Mitchell et Young, 1985 ; Fyans *et al.*, 2015).

Le gène *oxr* (codant une oxydoréductase dépendante de la coenzyme F<sub>420</sub>) et le gène *sdr* (codant une réductase/déhydrogénase de courte chaîne) sont manquants dans l'ensemble de gènes *cfa* de *P. syringae*. Ces deux gènes sont nécessaires pour la production des phytotoxines coronafacoylé chez *S. scabiei* (Bown *et al.*, 2016). Ceci démontre que *S. scabiei* et *P. Syringae* ont des cascades de synthèse différentes pour produire des coronafacoyles.

#### 1.6.3.2. La dégradation du périoderme de la pomme de terre

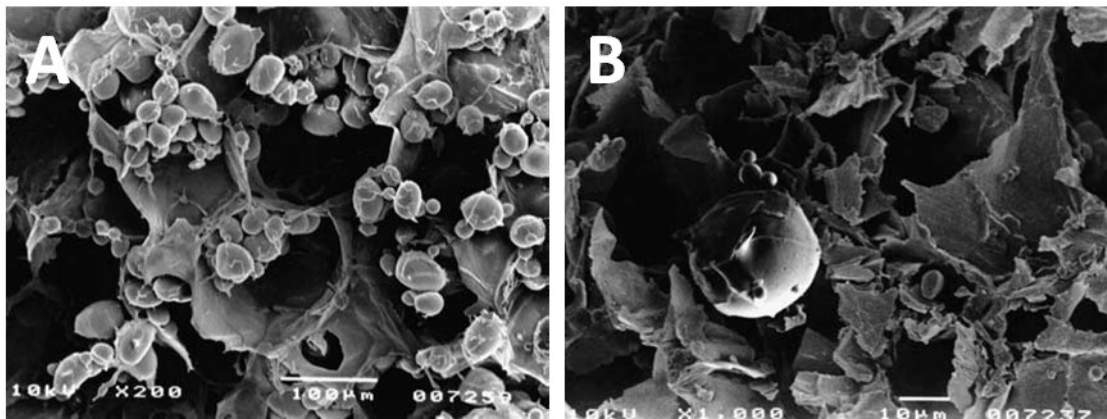
Lors de l'infection de la pomme de terre, les hyphes de *S. scabiei* pénètrent l'épiderme par des lenticelles ou des blessures (Agrios, 2005). Cependant, l'équipe de Loria a mis en évidence une pénétration directe des cellules épidermiques immatures par des hyphes (force mécanique) secondaires émergeant perpendiculairement des hyphes primaires pénétrés (Loria *et al.*, 2003). La

production d'hyphes par *S. scabiei* lui donne l'avantage de coloniser la pomme de terre (Figure 1.15A), car il semble se former une matrice d'attachement entre les hyphes de *S. scabiei* et les cellules du tubercule. Cette matrice a une structure similaire aux hydrophobines (Loria *et al.*, 2003, Figure 1.15B) qui sont des protéines sécrétées par certains champignons pathogènes. Ces protéines sécrétées vont se polymériser à l'interface hydrophobe-hydrophile (Tucker et Talbot, 2001). La polymérisation de ces protéines forme une sorte de membrane qui est très stable (Tucker et Talbot, 2001). Ainsi, la bactérie doit nécessairement produire une large gamme d'enzymes hydrolytiques pour dégrader les parois végétales et les cellules subérifiées afin de continuer la progression à l'intérieur du tubercule et la colonisation de pomme de terre. L'équipe de Błaszcak a observé des changements au niveau de la structure des cellules de la pomme de terre (Błaszcak *et al.*, 2005) à la suite de l'infection. Ainsi, lorsque le tubercule est infecté par la bactérie, les cellules du périoderme semblent être dégradées et déstructurées. Les enzymes hydrolytiques pourraient être responsables de ce phénomène (Figure 1.16). Pour se protéger, les cellules végétales de l'épiderme vont se subérifier. Cette succession de couches du périoderme subérisées va provoquer, comme expliqué précédemment, les lésions caractéristiques de la gale commune.



**Figure 1. 15. Colonisation des tissus de la pomme de terre par *S. scabiei*.**

(A) De petites hyphes perpendiculaires à l'hyphe primaire en train de pénétrer les tissus de la pomme de terre (flèches blanches), (B) Matrice d'attachement à l'interface entre les cellules de la pomme de terre et les hyphes de *S. scabiei*. La flèche montre la trace que laisse l'hyphe lorsqu'on l'enlève, ce qui suggère l'ancrage de la bactérie. (Loria *et al.*, 2003)



**Figure 1. 16. Organisation des cellules de la paroi de la pomme de terre.**

(A) Coupe transversale du périderme de pomme de terre sain, (B) Périderme de pomme de terre infecté par *S. scabiei* (Błaszczak *et al.*, 2005).

1.6.3.2.1. Enzymes extracellulaires pouvant être impliquées dans la dégradation de la paroi végétale.

Le périderme étant constitué des polysaccharides formant la paroi cellulaire et de subérine, différents types d'enzymes sont nécessaires à sa dégradation. Des enzymes capables d'hydrolyser des liens ester ainsi que des liaisons glycosidiques



sont nécessaires à la bactérie pour dégrader le périderme et la paroi cellulaire lors de l'infection des tubercules de pomme de terre.

Les hydrolases constituent une classe d'enzymes capables de catalyser des réactions d'hydrolyse des liens ester (estérases : carboxylester-hydrolases; phosphomonoestérases ; phosphodiesterases), des liaisons peptidiques (peptidases :  $\alpha$ -aminopeptido-aminoacide hydrolases,  $\alpha$ -carboxypeptido-aminoacide hydrolases ; peptidopeptide hydrolases = endopeptidases) et des liaisons osidiques (osidases : glucosidases).

#### 1.6.3.2.2. Les enzymes pouvant dégrader la subérine

Les cutinases sont des enzymes capables d'hydrolyser des biopolyesters. Elles sont produites par des rares bactéries et champignons (Purdy et Kolattukudy, 1975 ; Chen *et al.*, 2008 ; Kontkanen *et al.*, 2009). Les cutinases sont responsables de la dégradation de la cutine, mais certaines peuvent aussi dégrader la subérine, des triacylglycérols et des polyesters (Chen *et al.*, 2008). Les cutinases bactériennes et fongiques partagent la même spécificité pour le substrat et ont des propriétés catalytiques semblables, cependant le pH et la température optimale pour leur activité est variable selon le micro-organisme (Chen *et al.*, 2010). Une étude récente (Komeil *et al.*, 2013) a mis en évidence l'induction de l'enzyme Sub1, en présence de subérine ou de cutine chez *S. scabiei*. Le gène *sub1* a une homologie de séquence avec un gène fongique codant pour une estérase extracellulaire avec une activité cutinase/subérinase provenant de *Coprinopsis cinerea* (Kontkanen *et al.*, 2009). Ainsi la protéine codée par *sub1* est pressentie pour être la première subérinase bactérienne capable de dégrader la subérine. D'autres estérases pourraient être impliquées dans la dégradation de la partie polyaliphatique de la subérine. Les estérases (EC 3.1.1.x) représentent un groupe divers d'hydrolases qui catalysent la coupure de lien ester. Elles sont largement distribuées chez les

animaux, les plantes et les micro-organismes (Bornscheuer, 2002). Cependant, la présence de subérine dans le milieu de culture de *S. scabiei* n'induit pas que des estérases ou des subérinases. Des enzymes telles que des cholestérol estérases (capables d'hydrolyser des acides gras esters du cholestérol), des glycérophosphoryl diester phosphodiesterases (impliquées dans le métabolisme du glycérol et des lipides), des sphingolipide céramide N-decylases (pouvant détacher des groupements acyl présents dans la subérine), des endoglycosylcéramidases (enzymes capables d'hydrolyser des liens entre des oses et des céramides), des féruloyl estérases (une hydrolase qui catalyse les liens ester carboxyliques) ont été retrouvées dans le surnageant du milieu supplémenté par la subérine (Komeil *et al.*, 2014). Des études menées par l'équipe de Graça, ont montré que la dépolymérisation partielle de la subérine par méthanolyse relâche des féruloyl ésters (Graça and Santos, 2007). L'équipe de Komeil a mis en évidence la présence d'une féruloyl estérase (C9ZE96) qui était sécrétée en abondance dans le milieu contenant uniquement de la subérine. Il se pourrait que cette enzyme participe donc à la separation de la partie aliphatique et de la partie aromatique de la subérine (Komeil *et al.*, 2014). Récemment l'équipe de Graça a conduit d'autres études pour dépolymériser partiellement la subérine et mieux comprendre les liens intramoléculaires de celle-ci. Elle propose un modèle où les deux domaines (polyaliphatique et polyaromatique) sont liés par des acides féruliques (Graça *et al.*, 2015 ; Graça, 2015).

Il a été prouvé que chez certains champignons pathogènes comme *Fusarium solani*, l'induction des enzymes hydrolytiques est faite en présence de leur substrat. Ainsi, lorsque *F. solani* est en présence de cutine, la production de la cutinase est induite (Lin, T.S. et Kolattukundy, P.E. ; 1978). On peut supposer que la subérine induit la production d'estérases et de Sub1 chez *S. scabiei*, car des composés faisant partie de la subérine vont agir comme des inducteurs de ces enzymes hydrolytiques (McQueen et Schottel, 1987).

Une étude récente a mis en évidence la dégradation de la subérine par *S. scabiei*. En effet, Beaulieu *et al.* (2016) ont analysé le sécrétome de *S. scabiei* en présence de subérine comme seule source de carbone. Des enzymes impliquées dans le métabolisme des lipides ont été retrouvées dans le sécrétome et leur abondance a augmenté au fur et mesure de la durée de l'expérience. Les enzymes lipolytiques induites par la subérine semblent être à l'origine de la dépolymérisation de la partie aliphatique du polymère végétal puisqu'il a été mis en évidence que la proportion de certains composés aliphatiques dans le périderme de la pomme de terre a diminué à la fin des 60 jours d'incubation.

#### 1.6.3.2.3. Les glycosides hydrolases

Les glycosides hydrolases font partie d'un groupe très répandu d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse de liaisons glycosidiques en transférant un groupement glycosyl d'un sucre donneur à une molécule d'eau pour libérer un composé osidique. La très grande variation stéréochimique des saccharides ainsi que les multiples possibilités d'assemblage entre ces derniers font des glycosides hydrolases un groupe très varié d'enzymes. Elles sont impliquées dans de nombreux processus biologiques comme la dégradation des polysaccharides (cellulose, chitine, chitosane, etc.) ou le métabolisme cellulaire (amidon, mannose, etc.) et sont par conséquent ubiquitaires. Avec les glycosyl transférases, les glycosides hydrolases sont les deux classes majeures d'enzymes impliquées dans la synthèse et rupture des liaisons osidiques. Les glycosides hydrolases peuvent être classées de plusieurs façons. La façon la plus simple est basée sur leurs spécificités de substrat. Ce mode de classification est basé sur les recommandations de l'International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) et est associé à un numéro EC unique pour chaque type d'enzymes. Cette classification est problématique pour les enzymes qui agissent sur plusieurs substrats. Ceci est particulièrement vrai pour les glycosides hydrolases qui souvent agissent sur des polysaccharides très complexes et présentent un large spectre de

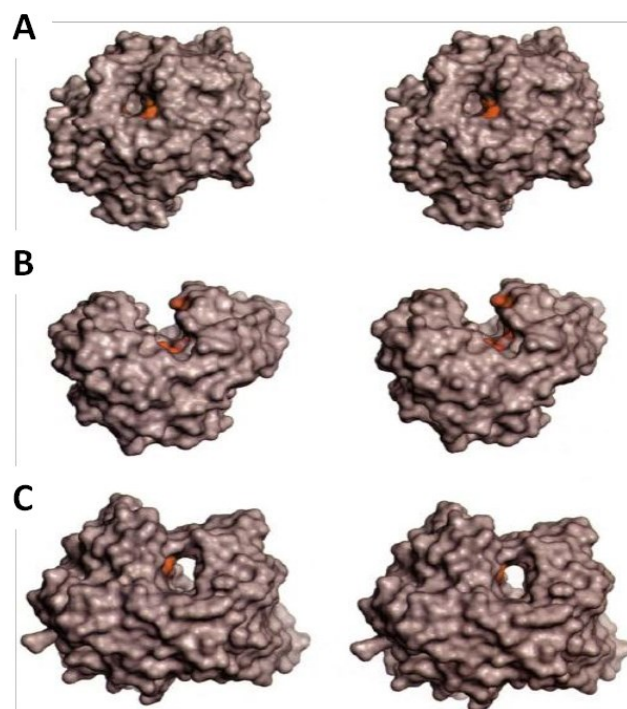
substrats. Par exemple, les endoglucanases, considérées comme typiquement des cellulases peuvent aussi être actives sur d'autres substrats (xylane,  $\beta$ -glucane, chitosane, etc.) à des degrés divers (Henrissat et Davies, 1997).

Une autre forme de classification des glycosyl hydrolases est déterminée selon leur mode d'action sur un polysaccharide. La structure tridimensionnelle du site actif reflète leur mode d'action. Les résidus catalytiques de ces enzymes sont en général retrouvés dans trois types de structures tridimensionnelles du site actif (topologies) : la poche (pocket), le sillon (cleft) et le tunnel (tunnel) (Figure 1.17). Les exo-glycosidases qui sont en général spécifiques pour l'extrémité terminale d'une chaîne de polysaccharides ont tendance à avoir leur site actif à l'intérieur d'une poche. La profondeur ainsi que la forme de cette poche reflètent le nombre de sites secondaires qui contribuent à la liaison et la longueur du groupe partant. Elles comprennent entre autres les glucoamylases, les  $\beta$ -galactosidases, les  $\beta$ -glucosidases et les  $\beta$ -amylases. Le site actif des endo-enzymes est situé dans un sillon ouvert qui permet une liaison et une action aléatoire à l'intérieur d'une chaîne de polymère. Elles comprennent les lysozymes, les endocellulases, les chitinases, les chitosanases, les  $\alpha$ -amylases, les xylanases, les  $\beta$ -1,3 glucanases, etc. Cependant, les endo-enzymes qui dégradent les polysaccharides fibreux avec peu de chaînes terminales exposées comme la cellulose doivent en plus avoir un mode d'action processif pour être capables d'hydrolyser plusieurs liaisons sans pour autant relâcher la chaîne de polysaccharide (Henrissat et Davies, 1997). Finalement, les glycosyl hydrolases peuvent être classées en fonction de leur séquence.

La méthode de classification basée sur la comparaison de séquences est très utile pour apporter une première hypothèse concernant le rôle d'une protéine dont la séquence est connue, mais pour laquelle la fonction n'a pas encore été démontrée. Le principe de cette classification se base sur le fait qu'il existe une relation directe entre similarité de séquences et repliement tridimensionnel et par conséquent la

structure de la protéine et de son site actif, peut être déduit sur l'ordre de la séquence en acides aminés. Ainsi, les glycosyl hydrolases sont regroupées dans des familles, en fonction des similitudes dans leur séquence d'acides aminés. La classification CAZY (Carbohydrate-Active enZYmes) tient en compte les relations entre la séquence et le repliement des enzymes pour leur classement. À ce jour, il existe 144 familles de glycosyl hydrolases (CAZypedia, mars 2017).

L'hydrolyse des liaisons  $\beta$ -1,4 glycosidique de la cellulose est réalisée par des mélanges d'enzymes hydrolytiques nommées collectivement des cellulases. Ces cellulases incluent des enzymes qui hydrolysent en synergie des liaisons internes (les endoglucanases) et des liaisons externes (cellobiohydrolases) (Dashtban *et al.*, 2009). Les produits résultant de ces hydrolyses, le cellobiose et le cellodextrine, inhibent l'activité endoglucanase et cellobiohydrolase. Ainsi, l'hydrolyse efficace de la cellulose requiert la présence de  $\beta$ -glucosidases pour briser les liaisons glycosidiques finales et produire du glucose (Maki *et al.*, 2009).



**Figure 1. 17. Les trois types de sites actifs retrouvés chez les glycosyl hydrolases.**

A) La poche (glucoamylase de *A. awamori*), B) le sillon (endoglucanase E2 de *T. fusca*), C) le tunnel (cellobiohydrolase II de *T. reesei*). (Davies et Henrissat, 1995)

En plus des cellulases, *Streptomyces scabiei* possède de nombreuses autres enzymes qui dégradent des hémicelluloses comme les mannosidases, les xylanases/cellulases et les cellobioses hydrolases (Joshi *et al.*, 2010). Les études de Komeil *et al.* (2014) ont démontré que la subérine induisait la production d'une grande quantité de glycosyl hydrolases telles que des cellulases, de xylanases et de lichéninases. Ce résultat était inattendu, car la subérine comporte très peu de polysaccharides contaminants et c'était la seule source de carbone dans le milieu de culture de *S. scabiei*. Les glycosyl hydrolases et spécialement les cellulases de *S. scabiei*, ont un grand intérêt car peuvent être possiblement impliquées dans la pathogenèse, car elles seraient capables d'hydrolyser les liens  $\beta$  des polyosides présents dans la paroi végétale.

**1.6.3.2.4. Induction des cellulases chez le genre *Streptomyces*.**

Les actinobactéries sont les principales bactéries responsables de la décomposition du matériel organique du sol. Elles sont capables de produire et sécréter un grand nombre de glycosyl hydrolases, tels des cellulases pour dégrader les résidus des plantes et du compost du sol. Bien que la plupart des *Streptomyces* produisent des cellulases, la régulation de celles-ci n'est pas complètement élucidée. On sait que généralement l'induction des glycosyl hydrolases chez les actinobactéries est faite en présence de son substrat. Plusieurs études ont mis en évidence que des substrats tels que la carboxyméthyl cellulose (CMC), la cellulose microcristalline ou le cellobiose étaient capables d'induire des cellulases (Walter et Schrenpf., 1996, Wilson, 1992 ; Chen et Wilson, 2007). Chez *Streptomyces reticuli*, l'induction de cellulases est induite seulement par de la cellulose insoluble (Avicel, cellulose

microcrystalline) et inhibée par la présence de cellulose soluble (CMC) (Schrempf et Walter, 1995). Chez *Thermomonospora fusca*, le cellobiose est le seul inducteur de la synthèse de cellulases (Lin et Wilson, 1987). D'autres substrats tels que les écorces du riz (Saritha *et al.*, 2013), les écorces du blé (Zeng *et al.*, 2013) et de lignocellulose (Godden *et al.*, 1989 ; Větrovský *et al.*, 2014) peuvent aussi induire des cellulases chez des actinobactéries. Plus étonnamment, des molécules différentes, n'ayant pas un lien chimique ou moléculaire avec le substrat des glycosyl hydrolases, peuvent être des inducteurs de celles-ci (Hodgson, 2000 ; Komeil *et al.*, 2013). Une étude a mis en évidence la production de cellulases chez *Streptomyces albaduncus* en absence de cellulose ou de toute autre molécule de dégradation de la cellulose (Harchand et Singh, 2001). De même, la subérine qui est un polymère complexe, ne contenant pas de polysaccharides, semble être un aussi bon inducteur de cellulases que la cellulose elle-même chez *S. scabiei* (Komeil *et al.*, 2013). Finalement, on s'attendrait à qu'un produit de dégradation de la cellulose, comme le cellobiose, soit un bon inducteur de cellulases, cependant ce n'est pas le cas chez certains *Streptomyces*. Il a été démontré chez *Streptomyces lividans* que la production de cellulases est inhibée par la présence de cellobiose (Wilson, 1992).

## 1.7. Voies de sécrétion

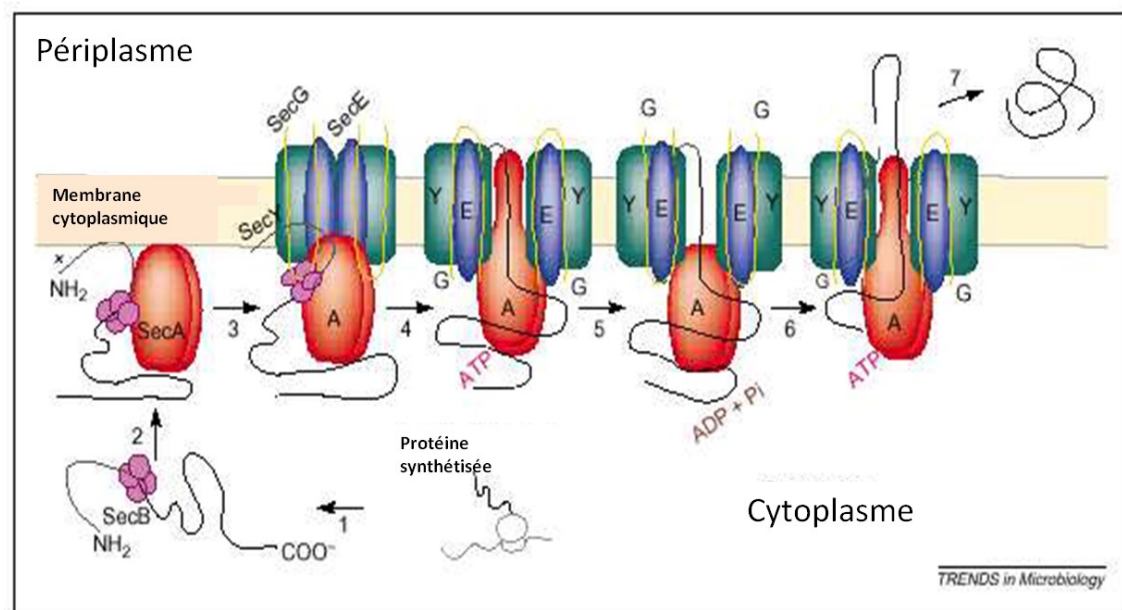
Les enzymes dégradant la cellulose et l'hémicellulose présentes dans la paroi végétale ainsi que les enzymes qui peuvent attaquer la subérine sont des enzymes extracellulaires. Ces enzymes peuvent emprunter différentes voies de sécrétion chez les streptomycètes, présentées ci-après.

### 1.7.1. Voie Sec

La voie de sécrétion Sec est une voie ubiquitaire, présente dans tous les organismes et essentielle à la vie car lorsqu'elle est mutée elle est létale. C'est la voie principale par laquelle les protéines sont exportées à travers la membrane

cytoplasmique chez les *Streptomyces* (Driessen et Nouwen, 2008). En plus d'être la voie principale de sécrétion des protéines, la voie Sec joue un rôle crucial dans l'assemblage de presque toutes les protéines membranaires. Les protéines membranaires sont insérées dans le canal Sec d'une façon co-translationnelle pendant qu'elles sont encore synthétisées. C'est le ribosome qui pousse le polypeptide pour passer à travers le canal Sec, bien que pour des boucles extracellulaires l'aide de la protéine SecA est nécessaire (Sääf et al., 1995). Les protéines membranaires néosynthétisées ont besoin du signal de reconnaissance des particules (SRP). Le signal SRP est un complexe de GTPase (Ffh) et un petit ARN (4.5S ARN). Le signal SRP interagit avec le domaine hydrophobe de la protéine membranaire pendant qu'elle émerge du ribosome et cible le polypeptide naissant du ribosome au récepteur SRP, une protéine membranaire qui se lie aux protéines SecYEG (de Leeuw et al., 2000 ; Angelini et al., 2005). Cette interaction du récepteur SRP avec le canal Sec permet de capturer le polypeptide naissant du ribosome pour initier le transport. Le SRP est attaché du côté N-terminal des peptides. Chez les bactéries de type Gram-positif, le peptide signal est de 29-31 acides aminés (von Heijne et Abrahmsen, 1989). Cette voie de sécrétion est empruntée par des protéines non conformées (Van den Berg et al., 2004). La source d'énergie utilisée pour la sécrétion de protéines est l'hydrolyse d'ATP, par Sec A (Figure 1.18). Le canal de sécrétion est formé par deux protéines SecY et deux protéines SecE (essentiels pour la sécrétion) et deux protéines SecG.



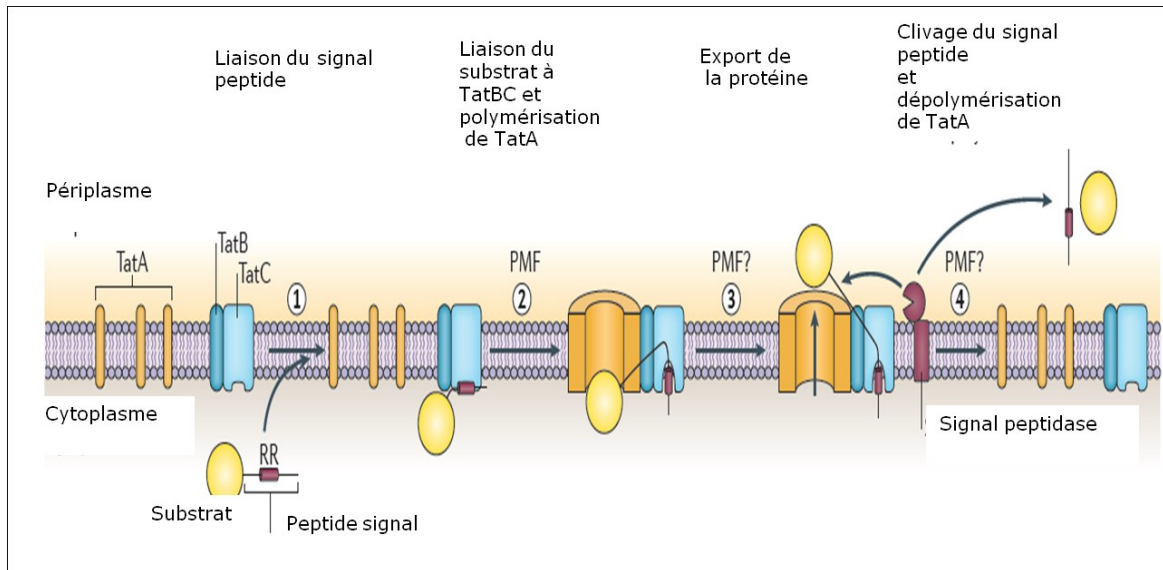


**Figure 1. 18. Schéma de la voie de sécrétion Sec (adapté de Mori et Ito, 2001).**

### 1.7.2. Voie Tat

Après la voie Sec, la voie Tat est la deuxième voie de transport des protéines. Elle se trouve dans les membranes cytoplasmiques des bactéries. Contrairement à la voie Sec, des composés de la machinerie Tat (Twin-Arginine Translocation) sont seulement encodés par des procaryotes : les bactéries de types Gram-négatif et Gram-positif et les *Archaea* (Berks *et al.*, 2000). Cette voie est absente chez les eucaryotes, à l'exception des chloroplastes et des mitochondries des plantes et de quelques protistes. La voie Tat transporte des protéines prépliées à travers la membrane cytoplasmique. Les protéines qui empruntent cette voie sont ciblées grâce à un peptide signal du côté N-terminal qui contient un motif d'acides aminés conservé de double arginine (Berks, 1996). Les *Streptomyces* exportent un grand nombre de protéines non-redox par cette voie. Il a été démontré que les agents pathogènes des plantes et des animaux ont besoin de la voie Tat pour leur virulence

(De Buck *et al.*, 2008). Ceci nous indique que cette voie peut être considérée comme un système de transport général pour les protéines, analogue à la voie Sec (Rose *et al.*, 2002 ; Dilks *et al.*, 2003 ; Widdick *et al.*, 2006). La voie Tat a pour source d'énergie la force protomotrice. Les composants de cette machinerie, chez les bactéries de type Gram-négatif et chez les actinobactéries Gram-positif, comprennent trois composantes membranaires, TatA, TatB et TatC. Généralement, ces trois composantes sont indispensables au fonctionnement de cette voie (Figure 1.19; Sargent *et al.*, 1998 ; Weiner *et al.*, 1998 ; Bogsch *et al.*, 1998).



**Figure 1. 19. Schéma de la voie Tat (adapté de Palmer *et al.*, 2012)**

### 1.7.3. Voie ESX

La voie de sécrétion de protéines ESX, a été récemment décrite chez les bactéries Gram-positif et est unique à celles-ci. La machinerie de cette voie de sécrétion comprend un gène FtsK/SpoIIIE-like ATPase (encodé comme un seul polypeptide chez les *Streptomyces*), à proximité de plusieurs protéines encodées, ayant un motif W-X-G. Cependant, il peut aussi sécréter des protéines sans signal peptidique (Abdallah *et al.*, 2006). Il est probable que la voie de sécrétion ait comme source d'énergie l'hydrolyse d'ATP, *via* l'ATPase. Le génome de *S. scabiei* code un seul système de sécrétion ESX, tandis que *S. griseus*, *S. avermitilis* et *S. coelicolor* encodent deux systèmes différents (Dyson, 2011). La fonction de ces systèmes est actuellement inconnue, cependant Akpe San Roman *et al.* (2010) ont mis en évidence un rôle dans la sporulation et Fyans *et al.* (2013) ont mis en évidence un rôle dans le développement de la bactérie.

### 1.8. Hypothèses de recherche.

Notre groupe de recherche s'intéresse aux *Streptomyces* phytopathogènes causant la gale commune de la pomme de terre et particulièrement *Streptomyces scabiei*. Notre groupe tente d'élucider les mécanismes liés à la virulence des souches et à leur capacité de coloniser les tubercules de pomme de terre. Au cours des dernières années, les travaux de notre groupe ont mis une emphase sur la fonction de la subérine dans la physiologie de la bactérie : production de thaxtomines (Lerat *et al.*, 2010), métabolisme secondaire (Lerat *et al.*, 2012), différenciation cellulaire (Lerat *et al.*, 2012), sécrétome (Komeil *et al.*, 2014). Dans le cadre de cette étude, nous continuons dans la même veine en étudiant la relation entre la subérine et les systèmes cellulolytiques des *Streptomyces* phytopathogènes. Nos hypothèses de travail sont les suivantes :

- i) La capacité de la subérine à induire la production d'enzymes classées comme des glycosides hydrolases n'est pas due au fait que certains résidus de la paroi cellulaire (cellulose et hémicellulose) restent accrochés à la subérine lors de son extraction.
- ii) *S. scabiei* produit davantage de glycosyl hydrolases et en particulier des cellulases en présence de subérine qu'en présence de polysaccharides.
- iii) Le cellobiose, le principal produit de dégradation de la cellulose, n'est pas un bon inducteur des cellulases chez les *Streptomyces* phytopathogènes.

### 1.9. Objectif du projet doctoral.

Beaucoup d'études sur le sujet de la gale commune de la pomme de terre sont orientées vers la thaxtomine, élément essentiel à la virulence de la bactérie. Lors des travaux réalisés au sein de notre laboratoire, il a été démontré que la thaxtomine est produite en grande quantité lorsque *S. scabiei* est cultivé en présence de

subérine et cellobiose (Lerat *et al.*, 2010) et l'on peut supposer que le cellobiose nécessaire au déclenchement des mécanismes de virulence provient de l'action des cellulases de *S. scabiei* sur les parois végétales de la pomme de terre.

De plus, des études protéomiques visant à identifier les protéines produites pour dégrader la subérine, ont mis en évidence que la subérine induit la production d'enzymes extracellulaires, parmi lesquelles, de nombreuses enzymes ont été identifiées comme étant potentiellement des enzymes hydrolysant la cellulose et les hémicelluloses. Mon projet vise à apporter des éléments de réponses permettant d'expliquer pourquoi la subérine induit la production de cellulases extracellulaires chez la souche *S. scabiei* EF-35.

Les résultats de cette recherche pourraient nous aider à comprendre le mode d'action lié à la pathogénicité de la bactérie, toujours en lien avec la production de thaxtamine A, puisque la bactérie semble avoir besoin de cellobiose pour induire la biosynthèse de la phytotoxine. Ainsi, la production de différentes enzymes hydrolytiques par *S. scabiei* EF-35 lui permettrait de dégrader une large gamme de substrats, ce qui pourrait lui assurer la disponibilité de cellobiose pour induire la production de la phytotoxine.

CHAPITRE 2

**LA SUBÉRINE RÉGULE LA PRODUCTION DES ENZYMES  
CELLULOLYTIQUES CHEZ *STREPTOMYCES SCABIEI*, L'AGENT  
PATHOGÈNE RESPONSABLE DE LA GALE COMMUNE DE LA POMME DE  
TERRE.**

2.1. Préambule

Il a été préalablement démontré que la subérine, une composante importante du périoderme de pommes de terre, induisait chez *S. scabiei* la production de thaxtominine A, une toxine essentielle au pouvoir pathogène de cette bactérie causant la gale commune. Dans cette étude, l'hypothèse a été émise que la subérine induisait également la production de glycosyl hydrolases dont les cellulases. Il a été démontré que la subérine induisait effectivement la production de glycosyl hydrolases lorsqu'elle était ajoutée à des milieux de culture contenant de la cellulose, du xylane ou de la lichénine. Les analyses du sécrétome de cette bactérie ont révélé que l'addition de subérine à un milieu contenant de la cellulose induisait une surproduction de glycosyl hydrolases. Par exemple, dix des onze cellulases produites par *S. scabiei* dans un milieu contenant de la cellulose étaient stimulées en présence de subérine. Dans la plupart des cas, les gènes codant les cellulases étaient également surexprimés dans un milieu contenant de la subérine et de la cellulose que dans des milieux contenant un seul de ces deux substrats. D'autre part, en présence de cellulose seulement, la bactérie produit une grande quantité d'un inhibiteur de subtilase (SCAB\_8801). La subtilase pourrait jouer un rôle dans la différenciation cellulaire et le métabolisme secondaire. Ces résultats ont permis de proposer un modèle de la mise en branle des mécanismes de virulence de la bactérie en présence de cellulose et de subérine.

Les résultats de ces travaux sont présentés à la section 2.2 et ont été publiés dans le journal *Microbes and Environments* (2015, **30**(3) :245-53), sous l'intitulé «Suberin regulates the production of cellulolytic enzymes in *Streptomyces scabiei*, the causal agent of potato common scab ». Les auteurs de la publication sont : Padilla-Reynaud, R; Simao-Beaunoir, A.-M., Lerat, S., Bernards, M.A., Beaulieu, C.

La contribution de chaque auteur dans l'article est comme suit : j'ai effectué l'ensemble des expériences à l'exception des travaux d'expression génétique qui ont été effectués par S. Lerat. L'analyse bio-informatique du sécrétome a été réalisée sous la supervision de A.-M. Simao-Beaunoir. J'ai rédigé l'article en collaboration avec les autres co-auteurs. L'ensemble des travaux a été supervisé par C. Beaulieu.

2.2. Suberin regulates the production of cellulolytic enzymes in *Streptomyces scabiei*, the causal agent of potato common scab

Topic of the manuscript: Microbial interactions and interrelations with other organisms

Running headline: Suberin influence on *S. scabiei* cellulases

REBECA PADILLA-REYNAUD<sup>1</sup>, ANNE-MARIE SIMAO-BEAUNOIR<sup>1</sup>, SYLVAIN LERAT<sup>1</sup>, MARK A. BERNARDS<sup>2</sup> and CAROLE BEAULIEU<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Centre SÈVE, Département de Biologie, Université de Sherbrooke, Sherbrooke (QC), J1K 2R1, Canada; and

<sup>2</sup>Department of Biology, University of Western Ontario, London (ON), N6A 5B7, Canada

\* corresponding author: [carole.beaulieu@usherbrooke.ca](mailto:carole.beaulieu@usherbrooke.ca), +1-819-821-8000 x.62997



## Abstract

Suberin, a major constituent of potato periderm, is known to promote the production of thaxtomins, the key virulence factors of the common scab-causing agent *Streptomyces scabiei*. In this study, it was speculated that suberin could also affect the production of glycosyl hydrolases, such as cellulases, by *S. scabiei*. Suberin was shown to promote glycosyl hydrolase activity when added to cellulose-, xylan- or lichenin-containing media. Furthermore, secretome analyses revealed that the addition of suberin to a cellulose-containing medium induced an increased production of glycosyl hydrolases. For instance, production of 13 out of the 14 cellulases produced by *S. scabiei* in cellulose-containing medium was stimulated by the presence of suberin. In most cases, transcription of the corresponding cellulase-encoding genes was also considerably increased when the bacterium was grown in the presence of both suberin and cellulose. It was also observed that the level of a subtilase-like protease inhibitor was considerably decreased by the presence of suberin. We propose a model for the onset of *S. scabiei* virulence mechanisms by both cellulose and suberin, the main degradation product of cellulose acting as an inducer of the thaxtomin biosynthetic genes and suberin promoting biosynthesis of secondary metabolites including thaxtomins.

Key words: cellulase, glycosyl hydrolases, proteomics, *Streptomyces scabiei*, thaxtomins.

## Introduction

*Streptomyces* species are Gram-positive bacteria belonging to the phylum *Actinobacteria* and exhibit a complex morphological development. After germination, *Streptomyces* spores produce germ tubes that grow by tip extension and branch to form vegetative mycelium. This mycelium differentiates by forming a second aerial mycelium that will eventually septate to form spores. Most *Streptomyces* species are saprophytic soil inhabitants, but some, such as *Streptomyces scabiei*, are plant pathogens (35). *S. scabiei* is one of the main agents of potato common scab. This plant pathogen induces symptoms ranging from corky patches to deep-pitted lesions on the surface of tubers, which reduce the value of affected potatoes (20). The pathogenicity of *S. scabiei* depends on the production of thaxtomins (17, 19), secondary metabolites that inhibit cellulose biosynthesis and deposition in plant cells (47).

Transcription of *S. scabiei* thaxtomin biosynthetic genes (*txt* genes) is induced in the presence of plant-derived material such as suberin and cellobiose (31). The role of cellobiose in triggering thaxtomin production has been elucidated. Cellobiose binds an AraC/XylS transcriptional regulator, TxtR, thus allowing the expression of *txt* genes (23). Furthermore, cellobiose inhibits the attachment of the cellulose-utilization repressor CebR to binding sites of the *txt* gene cluster (14). On the other hand, the effect of suberin on *txt* genes expression still is unclear although Lerat *et al.* (31, 32) proposed that suberin activates both differentiation and production of secondary metabolites including thaxtomins in several *Streptomyces* species.

Suberin is a recalcitrant plant polymer composed of a polyaromatic domain covalently linked to a polyaliphatic domain (5). The polyaromatic domain, a lignin-like structure, is embedded in the primary cell wall and consists largely of hydroxycinnamic acid-monolignol (4). The polyaliphatic domain is composed of

polyesters of long-chain fatty acids and glycerol, located between the primary cell wall and the plasma membrane. Its chemical structure is related to cutin, a polymer covering the aerial parts of plants (39). Suberin is believed to play a protective role against common scab disease. Correlation between phenolic acid composition of suberin and cultivar resistance to common scab has been established (49) whereas Khatri *et al.* (26) observed a higher suberization of potato periderm in a common scab tolerant cultivar than in a susceptible one.

As soil dwelling organisms, *Streptomyces* species feed on plant polymers. The genus is known for its ability to produce a wide variety of extracellular enzymes involved in the degradation of cellulose, hemicellulose and recalcitrant plant polymers such as lignin (40, 51). *S. scabiei* can colonize potato periderm. The outer layer of the periderm, the phellem, consists of suberized cells (26). Increasing evidence supports that *S. scabiei* can at least partially degrade suberin. The bacterium is able to grow on suberin as a source of carbon (29) and it produces esterases in its presence (1). Furthermore, the *S. scabiei* genome encodes potential suberinase genes (29). One of these genes, *sub1*, has been shown to be specifically induced in the presence of suberin and cutin (29). Secretome analysis of *S. scabiei* cultures grown in the presence of suberin has also been carried out to identify enzymes potentially involved in suberin degradation (30). Several enzymes predicted to play a role in lipid metabolism were identified as candidate enzymes involved in suberin degradation. However, these enzymes accounted for a small fraction of the *S. scabiei* secretome, whereas glycosyl hydrolases represented the most abundant functional group of proteins in the supernatant of suberin-containing medium (30). Among the glycosyl hydrolases, several cellulases were identified, although most *S. scabiei* strains exhibit no or poor growth on cellulose (13).

In this study, the effect of suberin on the production of glycosyl hydrolases and on the expression of cellulase-encoding genes was tested. Furthermore, the secretomes of *S. scabiei* grown in media containing either cellulose or both cellulose

and suberin were compared. A model of the onset of *S. scabiei* virulence mechanism by both cellulose and suberin is proposed.

## Materials and Methods

### Bacterial strain and growth conditions

*Streptomyces scabiei* strain EF-35 was isolated in Canada from a common scab lesion on a potato tuber (12). Bacterial inoculum was prepared by inoculating approximately  $10^8$  spores in 25 mL of YME (4 g L<sup>-1</sup> of glucose, 4 g L<sup>-1</sup> of yeast extract and 10 g L<sup>-1</sup> of malt extract). The culture was incubated with shaking (250 rpm) for 48 h at 30°C, after which the bacterial cells were recovered by centrifugation ( $3,500 \times g$ ) for 10 min. Bacterial inoculum was obtained by resuspending the pellet in 5 volumes of saline (NaCl 0.85%). The inoculum (200 µL) was transferred to 50 mL of a control medium (CM) composed of 0.5 g.L<sup>-1</sup> L-asparagine, 0.5 g.L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2 g.L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 10 mg.L<sup>-1</sup> FeSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O and 0.05% (w/v) casein hydrolysate (Sigma, St-Louis, MO, USA) supplemented or not with 0.1% (w/v) suberin and/or with 0.5% (w/v) of an additional carbon source: insoluble microcrystalline cellulose Avicel® (EMD Millipore, Billerica, MA, USA), xylan (oat spelt, Sigma) or lichenin (also known as lichenan) (Megazyme, Wicklow, Ireland). Cultures were incubated with shaking (250 rpm) for 5 days at 30°C.

Suberin used in this study was extracted from potato tubers as described in Kolattukudy and Agrawal (28). The amount of residual glucose in the purified polymer was determined according to Blakeney *et al.* (6). The alditol acetate derivatives of glucose, obtained by hydrolysis, reduction and acetylation of the suberin preparation, were quantified by gas chromatography on a Varian 3800 GC equipped with a flame-ionization detector (FID) and a CP-Sil 88 column (48). The experiment was carried out with five replicates.

### Extracellular protein quantification and concentration determination

Extracellular proteins were recovered by centrifuging the bacterial cultures ( $3,500 \times g$ ) for 15 min at 4°C. Protein concentration of *S. scabiei* culture supernatants was determined according to Bradford (7) using bovine serum albumin as a standard. For proteomic assays, supernatants were concentrated to a final volume of 500 µL using Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filters-3K and the proteins were resuspended in 5 volumes of 100% pre-chilled acetone and kept for 3 h at -20°C. Proteins were recovered by centrifugation ( $14,000 \times g$ , 20 min, 4°C) and the protein pellets were air-dried and resuspended in 80 µL of a buffer composed of 8 M urea, 2% (w/v) CHAPS, 2% (v/v) IPG buffer pH 4-7 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), 18.15 mM DTT and 0.002% bromophenol blue stock solution in 50 mM Tris-base. A final centrifugation ( $14,000 \times g$ ) was carried out for 5 min at 4°C to remove insoluble material and the protein solutions were immediately subjected to proteomic analysis.

#### Isolation of genomic DNA

Bacterial biomass was estimated by cellular DNA quantification. Genomic DNA was extracted according to the procedure of Kieser *et al.* (27). Genomic DNA was resuspended in 500 µL of a buffer containing 10 mM Tris-HCl and 1 mM disodium EDTA (pH 8.0) (TE buffer) and further purified. Two µL of RNase [ $10 \text{ mg mL}^{-1}$ ] was added to the DNA solution followed by incubation for 1 h at 37°C. Chloroform (250 µL) was added to the DNA solution and mixed by inversion. The mixture was centrifuged 10 min at  $3,500 \times g$ . Two hundred fifty microliters of 3 M sodium acetate, pH 5.2 and 1 mL of 2-propanol were mixed to the upper phase and the solution was centrifuged 10 min at  $3,500 \times g$ . The pellet was rinsed with 70% ethanol and resuspended in 400 µL of TE buffer. DNA was then quantified using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's specifications.

#### Enzymatic assays

Cellulase, xylanase and licheninase activities associated with *S. scabiei* culture supernatants were determined according to Lever (33) as further described in Komeil *et al.* (30).

### Proteomics analysis

Extracellular proteins were subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis [10% (w/v) SDS-PAGE] according to Komeil *et al.* (30). Horizontal slices were cut across the SDS-PAGE gel and used to perform proteomic analysis. In-gel protein digestion and mass spectrometry were carried out at the Proteomics Platform of the Eastern Quebec Genomics Center (Quebec City, QC, Canada) using a quadrupole time-of-flight mass spectrometer Qq-TOF (Sciex, Concord, ON, Canada) coupled to a HPLC for separation of peptides used with a nanospray source. This system allows a resolution of more than 30,000 FWHM with an accuracy of < 2 ppm and an acquisition rate of 50 MS/MS per second.

All MS/MS spectra were analyzed for peptide identification using Mascot (Matrix Science, London, UK; version 2.2.0) to search the *S. scabiei* strain 87.22 Uniref100 database based on trypsin digestion, a fragment ion mass tolerance of 0.50 Da and a parent ion tolerance of 2.0 Da. The search results were uploaded to the scaffold software program and a filter was set with a 99% minimum protein ID probability with a minimum number of two unique peptides by protein in which the cutoffs for peptide thresholds were 90%. Protein functions were reanalyzed using various databases such as GenBank, Pfam protein-domain/family, COG (50) and CAZy (34) as well as PRIAM (10) and KEGG resources (25). Phobius (24), SignalP 4.1 (43), SecretomeP (2), TatP (2) and Tatfind 1.4 (45) analyses were used to predict protein cellular localizations. A normalized spectral abundance factor (NSAF) was calculated for each protein that met the filtering criteria by dividing the proportion between the number of spectral counts (SpC) of a protein in culture medium and its

molecular weight (MW) by the sum of SpC/MW of all proteins meeting the filtering criteria and found in the same medium (41).

## Gene expression

The effect of carbon sources on gene expression was determined as follows. Five mL of each culture medium were sampled after 5 days of growth. One milliliter of stop solution (ethanol/acidic phenol, 95:5, (v/v)) was added to each sample to prevent RNA degradation. Bacterial cells were recovered by a 10 min centrifugation at  $3,500 \times g$  and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until RNA extraction. Total RNA was extracted from cells with the NucleoSpin RNA II kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) following the manufacturer's instructions. Cell lysis was improved by a sonication step ( $2 \times 30$  s) before phenol/chloroform extraction. An additional DNA digestion step was performed after elution with Turbo DNA-free kit (Ambion, Austin, TX, USA). cDNA was synthesized by reverse transcription using 2  $\mu\text{g}$  of total RNA with the First-Strand cDNA Synthesis kit (GE Healthcare) using 72% G+C-rich random hexamers. Quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) of gene transcripts was performed using a Mx3000P (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) with SYBR Green PCR master mix and JumpStart Taq DNA Polymerase (Sigma). PCR cycles were  $95^{\circ}\text{C}$  for 5 min followed by 35 cycles at  $95^{\circ}\text{C}$  for 15 s and  $60^{\circ}\text{C}$  for 45 s. Primers used in this study are listed in Table 2.1. Gene *gyrA* was used as a reference for internal control of relative quantification. Relative gene expression was determined by the comparative  $C_T$  method (44).

**Table 2. 1. Primers used in this study**

Gene assignment	Predicted function of the corresponding protein	Primer sets (5'–3')
SCAB_24291	Gyrase A ( <i>gyrA</i> )	For-GGACATCCAGACGCAGTACA Rev-CTCGGTGTTGAGCTTCTCCT
SCAB_5981	Cellulase B precursor CelB	For-TGTTCAACGGGTGCCATTAC Rev-ACATAGCCGTACGAGATGCT
SCAB_16431	Cellulase CelA1	For-CATGAACCAGGCGCAGATA Rev-CCATGTAGACCCAGGTGTTG
SCAB_17001	Cellulase	For-TCGTCCAGCTGGTGATCTA Rev-GTCGATGTACTGCGTCTTGT
SCAB_17011	Cellulase	For-GAGGCGTACAGCTACCTCCTGTG Rev- GTAGAAGGAGTTGGTCGGCTGGTC
SCAB_17021	Cellulase	For-GACACCTACACCTGGAAGAAC Rev-CTTCTCCTTGCGGTTGAAGA
SCAB_36371	Xylanase/Cellulase	For-CTGAGAAGCCCGGGAAATC Rev-CACCCGTCACACACATGAA
SCAB_37051	Cellulase/Xylanase	For-ATTCTCCGGAAGCACATCAC Rev-TCCTCGAAGACCTCGTTCA
SCAB_51081	Cellulase	For-GGCATCAACTGGTTCGGTTTCGAG Rev-TGTTGTAGCCCAGCGACTTCATCT
SCAB_90081	Cellulase B precursor	For-TACAACGGCTGCCACTAC Rev-CTCGCATAGCTGTAGGAGATAC
SCAB_90091	Cellulase	For-AGGACAGCAGATACATCGAGGAGT Rev- TCAAGAAGATCGGCAACTGTGTGCG
SCAB_90101	Cellulase	For-TCGAGTTGGTCGCTGAAATG Rev-AAGCGTGCCGTTGTAGTT





## Results

Effect of the presence of suberin in polysaccharide-containing culture media on *Streptomyces scabiei* growth, extracellular protein production and enzymatic activities.

The amount of glucan remaining embedded in suberin preparation added to the culture medium was determined by quantifying glucose concentration. The average concentration of residual glucose was  $103 \pm 8 \mu\text{g mg purified suberin}^{-1}$ . The amount of glucose from suberin thus represented about 2% of the sugar present in control medium (CM) supplemented with cellulose (CM+C), xylan (CM+X) or lichenin (CM+L). The effect of adding suberin to those three latter media was determined on *S. scabiei* growth, on extracellular protein production and on enzymatic activity. Addition of suberin had different effects on *S. scabiei* growth depending on the polysaccharide that was available as a main carbon source. Suberin did not affect growth in xylan-, improved growth in cellulose- and inhibited growth in lichenin-containing medium (Table 2.2). While suberin appeared to be a better growth substrate than cellulose for *S. scabiei*, it was not the case for either xylan or lichenin. Biomass, estimated by DNA quantification, was approximately 8 to 10 times higher in the presence of these substrates than in CM+S (Table 2.2).

Addition of suberin did not modify the levels of extracellular proteins produced per  $\mu\text{g}$  of bacterial DNA in CM supplemented with cellulose, xylan or lichenin. In control medium supplemented with suberin (CM+S,  $141.7 \pm 11.7 \mu\text{g } \mu\text{g of DNA}^{-1}$ ), there were, however, approximately 5 to 10 times more extracellular proteins compared to CM supplemented with xylan (CM+X,  $28.2 \pm 2.6 \mu\text{g } \mu\text{g of DNA}^{-1}$ ) or with lichenin (CM+L,  $14.8 \pm 1.8 \mu\text{g } \mu\text{g of DNA}^{-1}$ ). The amounts of extracellular proteins associated with CM+S and CM supplemented with cellulose did not differ significantly (Table 2.2).

A 3- to 4-fold increase in cellulase, xylanase or licheninase activity was observed when suberin was added to CM+C, CM+X, and CM+L media. The licheninase activity was comparable in CM+L ( $17.4 \pm 0.8$  U  $\mu\text{g}$  of DNA<sup>-1</sup>) and in CM+S ( $19.0 \pm 4.3$  U  $\mu\text{g}$  of DNA<sup>-1</sup>) but both cellulase and xylanase activities were higher in CM+S ( $1.8 \pm 0.5$  U  $\mu\text{g}$  of DNA<sup>-1</sup>,  $35.1 \pm 8.2$  U  $\mu\text{g}$  of DNA<sup>-1</sup>, respectively) than in CM+C ( $0.7 \pm 0.6$  U  $\mu\text{g}$  of DNA<sup>-1</sup>) or CM+X ( $14.5 \pm 1.1$  U  $\mu\text{g}$  of DNA<sup>-1</sup>), respectively.

**Table 2. 2. Comparison of *Streptomyces scabiei* growth.**

Medium <sup>a</sup>	Relative growth (%) <sup>b,c</sup>	Relative protein concentration (%) <sup>b,d</sup>	Enzymatic activity tested <sup>b</sup>	Enzymatic activity (%) <sup>b,e</sup>
CM+X	793	20	Xylanolytic activity	41
CM+X+S	747	20	Xylanolytic activity	126
CM+L	965	10	Licheninase activity	92
CM+L+S	472	21	Licheninase activity	387
CM+C	36	79	Cellulase activity	39
CM+C+S	105	80	Cellulase activity	170

Extracellular protein concentration and enzymatic activities between suberin-containing control medium (100%) and control medium supplemented with a polysaccharide in the presence or absence of suberin.

<sup>a</sup> Control medium supplemented with xylan (CM+X), xylan and suberin (CM+X+S), lichenin (CM+L), lichenin and suberin (CM+L+S), microcrystalline cellulose (CM+C) or microcrystalline cellulose and suberin (CM+C+S).

<sup>b</sup> Data are the mean of three experiments.

<sup>c</sup> Growth was estimated by cellular DNA quantification.

<sup>d</sup> Protein concentration was estimated in  $\mu\text{g } \mu\text{g of DNA}^{-1}$ .

<sup>e</sup> Enzymatic activity was estimated in U  $\mu\text{g of DNA}^{-1}$ .

## Effect of suberin on the *Streptomyces scabiei* secretome in a cellulose-containing medium

Addition of suberin to a cellulose containing-medium only slightly affected the secretome diversity. A total of 115 and 125 proteins met the filtering criteria in CM+C and in the same medium supplemented of suberin (CM+C+S), respectively (Table S2). A total of 22 and 25 proteins were predicted to have an intracellular localization in CM+C and CM+C+S, respectively. The other predicted extracellular proteins were divided into 11 functional groups. Distribution of secreted proteins within the functional groups differed according to the growth medium. Figure 2.1 presents both normalized spectral abundance factor (NSAF) and the number of proteins associated with each functional group. In CM+C, proteins associated with the “general function predicted only” group had a NSAF of 31% and included the most abundant protein in the secretome (SCAB\_8801), a subtilase-like protease inhibitor with an NSAF of 26.02% (Figure 2.1A and Table S2). Proteins of unknown function included 28 proteins with a NSAF of 30%. The functional group “carbohydrate transport and metabolism” was composed of 23 proteins and had a NSAF of 13% (Figure 2.1A). Among those, 25 (NSAF = 14.18%) were putative glycosyl hydrolases (GH) belonging to seven GH families (Table 2.3). The most abundant GH were the putative cellulase C9ZD50 (NSAF of 1.86%) and a putative xylanase A (C9ZE95, NSAF of 1.84%). The GH group included nine putative cellulases with a combined NSAF of 3.9% (Table 2.3).

**Table 2. 3. Proteins involved in carbohydrate transport and metabolism.**

Uniprot accession number	Corresponding gene in <i>S. scabiei</i> 87.22 genome			Normalized spectral abundance factor (%)	
		Putative function	CAZy classification	CM+C	CM+C+S
Cellulases					
C9YVP5	SCAB_5981	Cellulase B precursor CelB	CE1	D <sup>a</sup>	0.94
C9Z0D5	SCAB_8871	Cellulase	CBM13	0.12	0.38
C9ZD50	SCAB_16431	Cellulase CelA1	GH6	1.86	3.06
C9ZEP9	SCAB_17001	Cellulase	GH6, CBM2	D	1.51
C9ZEQ0	SCAB_17011	Cellulase	GH48, CBM2	0.18	1.58
C9ZEQ1	SCAB_17021	Cellulase	GH74, CBM2	ND <sup>b</sup>	1.47
C9YUZ2	SCAB_36371	Xylanase/cellulase	GH10, CBM2	0.19	1.77
C9YW88	SCAB_37051	Cellulase/xylanase	GH10	0.46	2.06
C9YTK2	SCAB_51081	Cellulase	GH5, CBM2	0.22	0.75
C9ZB17	SCAB_77391	Cellulose 1,4- $\beta$ - cellobiosidase	NF <sup>c</sup>	ND	0.22
C9Z351	SCAB_86311	Cellulase	GH5	ND	0.30

C9Z9L5	SCAB_90081	Cellulase B precursor	GH12, CBM2	0.30	D
C9Z9L6	SCAB_90091	Cellulase	GH48, CBM2	0.34	2.38
C9Z9L7	SCAB_90101	Cellulase	GH6, CBM2	0.19	0.48

Other proteins involved in carbohydrate transport and metabolism

C9ZBE6	SCAB_0631	$\alpha$ -L-fucosidase	GH29, CBM13	ND	0.13
C9YYV2	SCAB_3881 or SCAB_22931	Arabinofuranosidase	GH62, CBM13	ND	0.68
C9YUC5	SCAB_4961	Glucuronoarabinoxylan endo-1,4- $\beta$ -xylanase	GH30	ND	0.49
C9YUG2	SCAB_5351	ABC-type sugar transport system	NF	1.27	0.71
C9YVN3	SCAB_5851	Glycosyl hydrolase	CBM32	ND	0.17
C9YVP9	SCAB_6021	Endo $\beta$ -1,4-xylanase	GH10	0.25	1.37
C9YYN8	SCAB_7551	Glycosyl hydrolase	NF	0.62	D
C9Z1T6	SCAB_9291 or SCAB_91051	Lactonase	NF	ND	0.26
C9Z1U5	SCAB_9381	Exo- $\alpha$ -sialidase	NF	ND	0.53

C9Z507	SCAB_11431	Glycosyl hydrolase	GH43	0.22	1.11
C9Z878	SCAB_13491	Glucan endo-1,3- $\beta$ -D-glucosidase	GH64	ND	0.13
C9ZD59	SCAB_16521	Arabinofuranosidase	GH43, CBM42	ND	1.81
C9ZD61	SCAB_16551	Mannosidase	GH26, CBM23	ND	0.11
C9YT63	SCAB_19561	$\beta$ -fructofuranosidase	GH43, CBM13	ND	0.23
C9YUL1	SCAB_19941	Arabinofuranosidase	GH43, CBM42	0.18	0.36
C9YVX8	SCAB_21021	Xylose ABC transporter substrate-binding protein	NF	0.49	ND
C9Z5F4	SCAB_42381	ABC transporter substrate-binding protein	NF	0.26	ND
C9Z5L1	SCAB_42951	Glucose / Sorbosone dehydrogenase	NF	0.93	9.47
C9Z737	SCAB_43661	Galactan endo-1,6- $\beta$ -galactosidase	GH30, CBM13	D	0.49
C9YY37	SCAB_54441	Enolase	NF	0.18	ND
C9Z2N2	SCAB_57161	Endo- $\beta$ -1,6-galactanase	GH30	ND	0.21



C9Z451	SCAB_57751	Cellobiose-binding transport system associated	NF	1.46	1.72
C9ZDW4	SCAB_63891	ABC-type xylose transport-system, periplasmic	NF	1.05	0.19
C9ZFW2	SCAB_66021	$\beta$ -xylosidase	GH43, CBM13	ND	0.32
C9ZFW3	SCAB_66031	Arabinofuranosidase	GH43, CBM42	D	1.09
C9YYF0	SCAB_70591	Pectate lyase	PL9	ND	0.72
C9Z2V1	SCAB_72711	Endo-1,4- $\beta$ -xylanase	GH11	D	0.62
C9Z2W0	SCAB_72801	Glycosyl hydrolase	NF	ND	1.05
C9Z4J7	SCAB_74141	$\alpha$ -N-furanosidase	GH51	ND	0.43
C9Z623	SCAB_74681	Licheninase	NF	ND	0.44
C9ZAZ8	SCAB_77201	Glycosyl hydrolase	GH106	ND	2.33
C9ZB22	SCAB_77441	$\alpha$ -arabinanase	GH93, CBM13	0.13	0.24
C9ZCR4	SCAB_78891	Glycosyl hydrolase	GH30, CBM13	ND	0.17
C9ZE74	SCAB_79011	Acetyl-xylan esterase	CE2	ND	0.80
C9ZE94	SCAB_79241	Arabinofuranosidase	GH62, CBM13	0.26	1.16
C9ZE95	SCAB_79251	Xylanase A	GH10, CBM13	1.84	10.25
C9ZEC5	SCAB_79561	Glycosyl hydrolase	GHnc, CBM13	ND	0.30

C9YU29	SCAB_82021	$\beta$ -mannosidase	GH5, CBM2	ND	0.51
C9Z1I5	SCAB_85231	Chitinase	GH19, CBM12	0.44	0.54
C9Z804	SCAB_89741	Cellulose-binding protein	CBM33	0.74	1.05

---

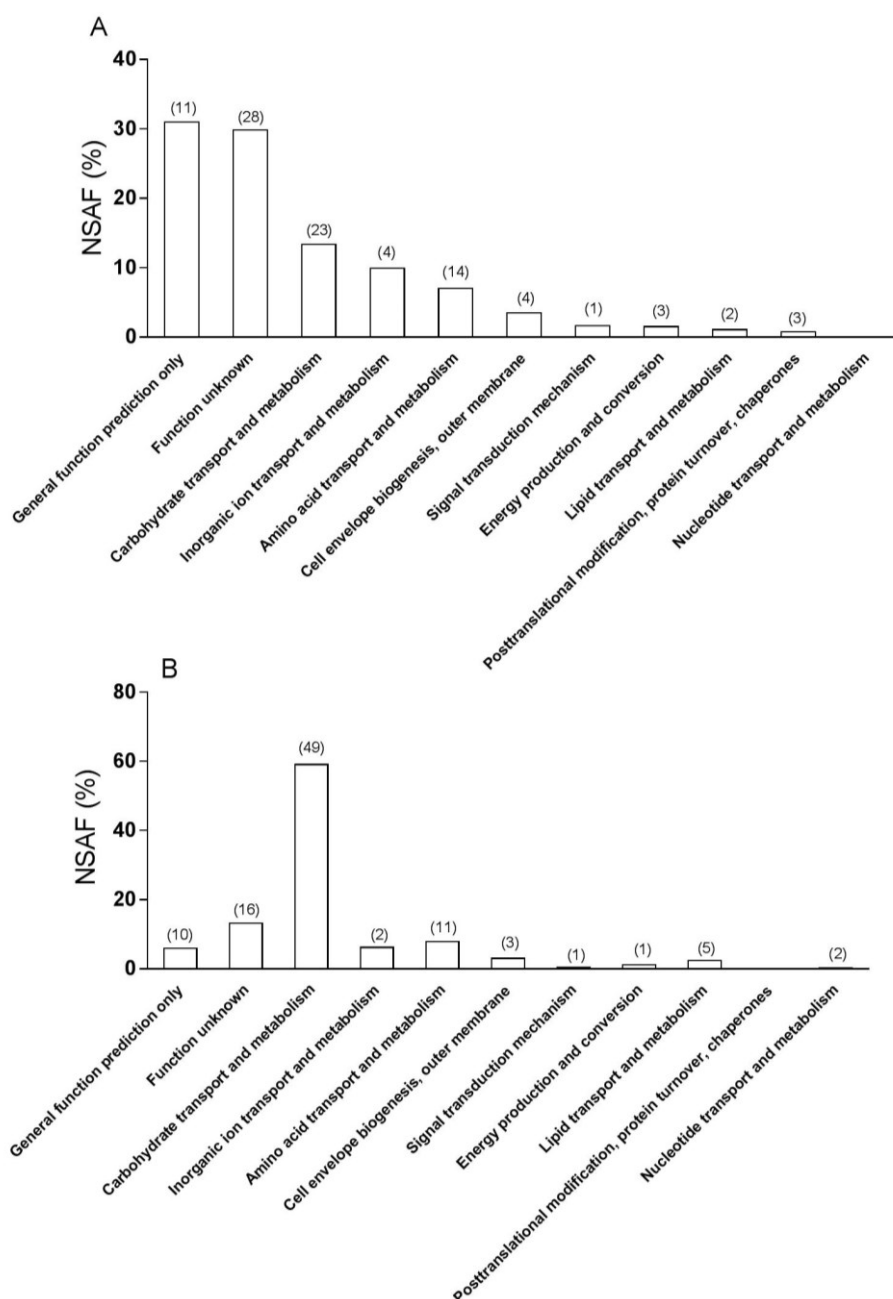
Proteins found to be secreted in the control medium supplemented with either microcrystalline cellulose or microcrystalline cellulose and suberin

<sup>a</sup> D: detected. Peptides have not fulfilled the filtering criteria described in the Materials and Methods section.

<sup>b</sup> ND: not detected.

<sup>c</sup> NF: no module has been found in the protein.

Addition of suberin to CM+C resulted in a strong reduction in the abundance of the subtilase-like protease inhibitor (NSAF of 1.1%) (Table S2). In contrast, suberin caused an increase in protein abundance for the “carbohydrate transport and metabolism” group (NSAF of 59%) (Figure 2.1B). The number of proteins in this group was approximatively 2-fold lower in CM+C (23 proteins) than in CM+C+S (49 proteins) (Figure 2.1). In CM+C+S, the two most abundant proteins with a respective NSAF of 10.3% and 9.5% were a putative xylanase A (C9ZE95) and a glucose/sorbose dehydrogenase predicted to be involved in glucose metabolism (C9Z5L1) (Table S2). When suberin was added to CM+C, the diversity of GH increased (Table 2.3) and these GH were distributed among 19 GH families (Table 2.3). Thirteen cellulases produced in CM+C+S met the filtering criteria (Table 2.3). These 13 predicted cellulases were more abundant in CM+C+S than in CM+C. The only cellulase that was more abundant in CM+C than in CM+C+S was cellulase B (C9Z9L5), which accounted for a NSAF of 0.30% in CM+C. This cellulase B was detected in CM+C+S but did not pass the filtering criteria.

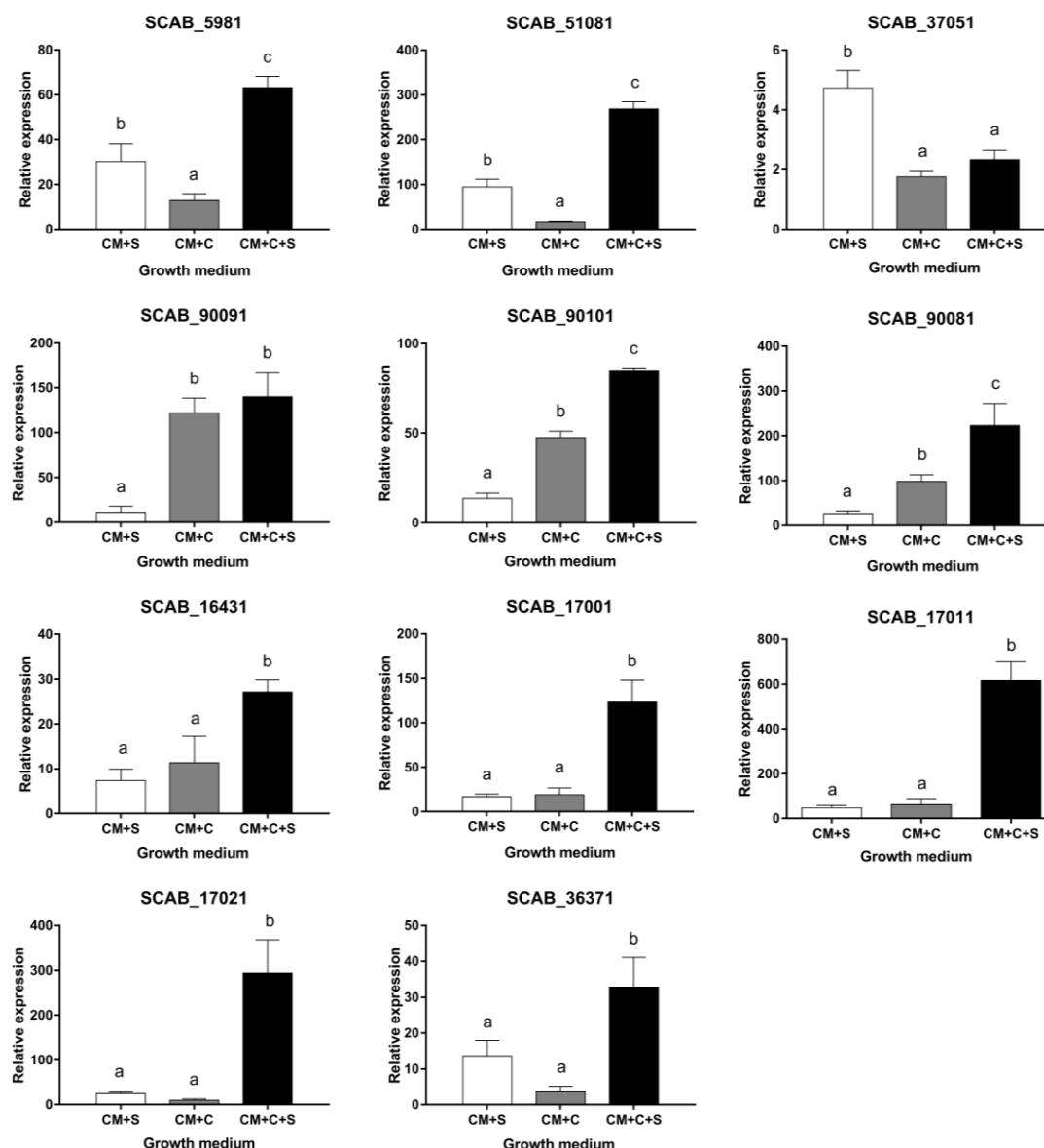


**Figure 2. 1. Normalized spectral abundance factor (NSAF) within functional groups of *Streptomyces scabiei* strain EF-35.**

Secreted proteins associated with control medium supplemented with microcrystalline cellulose (A) or both microcrystalline cellulose and suberin (B). Values into brackets represent the number of proteins found within functional groups.

## Effect of plant cell wall constituents on the expression of cellulase-encoding genes

Expression of 11 genes encoding cellulases found in the *S. scabiei* secretome was monitored in different growth media. Addition of cellulose, suberin or both polymers to the control medium (CM) induced gene expression of all cellulase-encoding genes tested. The expression levels of genes encoding cellulases SCAB\_16431, SCAB\_17001, SCAB\_17011, SCAB\_17021 and SCAB\_36371 were similar in media containing either suberin (CM+S) or microcrystalline cellulose (CM+C). Expression of genes encoding cellulases (SCAB\_90081, SCAB\_90091 and SCAB\_90101) was higher in the control medium supplemented with cellulose than in CM+S. In contrast, expression of cellulase-encoding genes SCAB\_5981, SCAB\_37051 and SCAB\_51081 was higher in CM+S than in CM+C. When suberin was added to the microcrystalline cellulose-containing medium, cellulase-encoding gene expression increased significantly, from 1.2- to 32-fold for all genes, except SCAB\_90091 and SCAB\_37051 (Figure 2.2).



**Figure 2. 2. Relative expression levels (± SD) of eleven targeted cellulases.**

Cellulases found in the secretome of *Streptomyces scabiei* EF-35 grown in control medium (CM) in the presence of suberin (CM+S, white bars), microcrystalline cellulose (CM+C, gray bars), or microcrystalline cellulose supplemented with suberin (CM+C+S, black bars). Data were normalized with the *gyrA* gene used as an internal control. Data shown are representative of three replicates. Data with the same letter are not significantly different ( $P < 0.05$ , LSD test).

## Discussion

A recent proteomic study (30) showed that a wide variety of extracellular glycosyl hydrolases were produced by the phytopathogen *S. scabiei* in the presence of suberin. It was thus speculated that suberin could affect extracellular enzymes production of *S. scabiei* when added to polysaccharides such as  $\beta$ -glucans (cellulose or lichenin) or xylan. The addition of suberin to a glucan- or xylan-containing medium did not modify the amount of secreted proteins per  $\mu\text{g}$  of bacterial DNA. However, the quantity of extracellular proteins was considerably higher in suberin- and cellulose-containing media compared to xylan- or lichenin-containing media. The amount of extracellular proteins was thus lower in media supporting a good growth (lichenin- or xylan-containing media) than in CM+S and cellulose-containing media. Such an upregulation in response to carbon-starving conditions of genes encoding enzymes hydrolyzing plant polysaccharides has previously been demonstrated (11, 53). As recalcitrant growth substrates, both cellulose and suberin could therefore trigger secretion of extracellular enzymes (18, 36, 37, 42). The poor ability of *S. scabiei* to grow in the presence of cellulose is nevertheless surprising considering the presence of several predicted cellulase- and  $\beta$ -glucanase-encoding genes in its genome. However, cellobiose, the main degradation product of cellulose, has been shown to be a poor inducer for endoglucanases in at least some streptomycetes (15), including *S. scabiei*. Although both cellobiose uptake and catabolism have been demonstrated in *S. scabiei* cells (31), *S. scabiei* cellulase activity in supernatant from CM supplemented with cellobiose was only  $0.05 \pm 0.02 \text{ U } \mu\text{g of DNA}^{-1}$  (data not shown), while the cellulolytic activity reached  $0.7 \pm 0.6 \text{ U } \mu\text{g of DNA}^{-1}$  in CM+C (see above in the Results section). The poor inducing ability of cellobiose may also explain the fact that some streptomycetes showed higher cellulase activity on complex organic materials such as straw than on purified cellulose (15, 46, 54, 55).

The present study has demonstrated that suberin is an inducer of glucanase and xylanase activities as good as, or even better than, polysaccharides. Furthermore, addition of suberin to a glucan- or xylan-containing medium increased glucanase or xylanase activity, respectively. This higher enzymatic activity was probably not due to an additional supply of polysaccharides provided by sugar residues attached to suberin, since (i) the amount of glucose embedded in this lipidic polymer represented only 2% of the glucose contained in the medium, and (ii) a suberin-containing medium supernatant from *S. scabiei* culture was unable to release reducing sugars from the suberin used in this study (data not shown).

Secretomes of *S. scabiei* cultivated in CM+C and CM+C+S were thus compared to determine if a supply of suberin induces specific glucanases or causes a general overproduction of glucanases. Proteomic analysis revealed that most GH associated with CM+C supernatant were predicted to cleave  $\beta$ ,1-4 links (cellulases, xylanase, chitinase), while several other types of GH were only found in the CM+C+S medium (pectate lyase,  $\beta$ -1,6 galactanase,  $\alpha$ -N-furanosidase,  $\alpha$ -arabinase,  $\beta$ -fucosidase, endo-1,3  $\beta$ -D-glucosidase, acetyl-xylan esterase, etc.). As with other soil streptomycetes, the *S. scabiei* genome encodes for a multiplicity of carbohydrate catabolic proteins, especially proteins involved in the degradation of plant-derived material. Expression of genes coding for plant cell wall-degrading enzymes is sometimes induced by molecules that bear no structural relation to the substrate (21). For example, production of cellulases in the absence of cellulose or its degradative products has been previously reported in *Streptomyces albaduncus* (18).

All cellulases found in the CM+C have been previously identified in *S. scabiei* cultures grown in the presence of suberin (30) and the amount of cellulases produced was generally higher when both polymers were present (this study). The expression of the cellulase-encoding genes was also generally higher when bacteria were exposed to both substrates compared to cellulose or suberin only. The



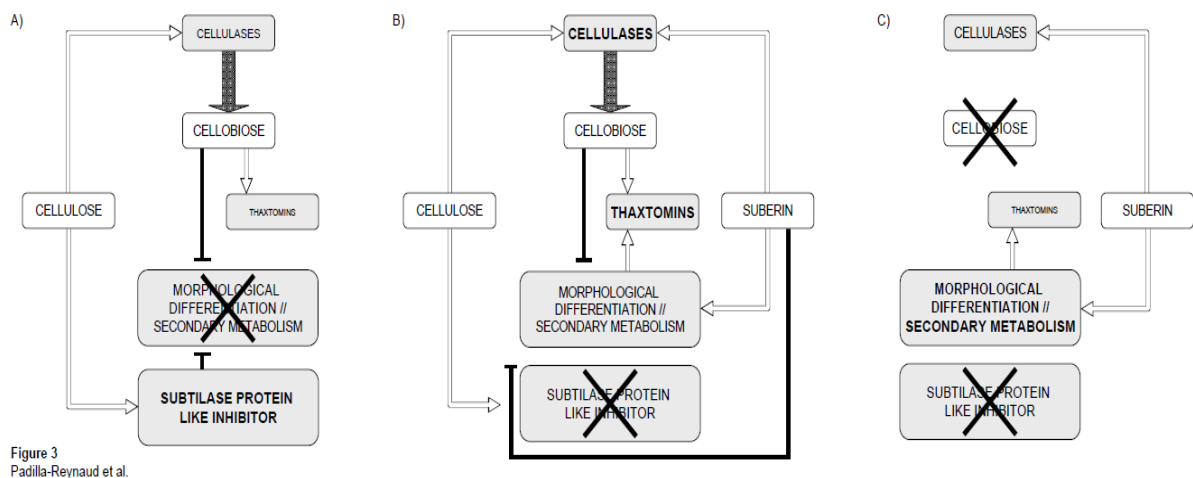
presence of both cellulose and suberin has an additive or even a synergistic effect on the transcription of most cellulase-encoding genes, suggesting that different environmental signals are necessary to ensure maximal cellulase-encoding gene expression.

The stimulatory effect of suberin on cellulase-encoding gene transcription may be due to its chemical composition. Chellapandi and Jani (9) showed that surfactants enhanced production of endoglucanases in some *Streptomyces* isolates. Esterases that have been shown to be produced by *S. scabiei* in the presence of suberin (30, 38) presumably release long chain fatty acids with hydroxyl or epoxy moieties that would have surfactant properties (37). Furthermore, some authors reported that phenolic compounds, including those encountered in the aromatic fraction of suberin, regulate the production of cellulolytic enzymes in some *Streptomyces* strains (15), as well as in fungi (16, 52).

The stimulating effect of suberin on cellulase-encoding gene transcription may also result from its ability to promote differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces* species (32). In some *Streptomyces* species, cellulase activity is low during primary metabolism but reaches a maximal level during secondary metabolism (9). However, Lerat *et al.* (31) have shown that cellobiose, the main degradation product of cellulose, blocks differentiation in *S. scabiei*, which exhibits a bald phenotype when grown in the presence of this disaccharide. The molecular mechanism by which cellobiose inhibits differentiation and secondary metabolism in different *Streptomyces* species is still unknown (31), but this study suggests that the subtilase-like protease inhibitor encoded by SCAB\_8801, which is present about 20-fold more in CM+C than in CM+C+S (Table S2), might be involved in the phenomenon. The role of subtilase protease inhibitors in holding off differentiation has been documented in several *Streptomyces* species (8). A reduction in the amount of the subtilase-like protease inhibitor when suberin was added to a

cellulose-containing medium is consistent with the fact that suberin promoted differentiation even in the presence of cellobiose (31).

We propose the following model by which the constituents of potato periderm promote the onset of *S. scabiei* virulence mechanisms (Figure 2.3). Major periderm constituents, cellulose and suberin, both play a role in triggering thaxtomin production. In the presence of cellulose only (Figure 2.3A), a low amount of cellulases is produced, allowing the release of cellobiose, the inducer of thaxtomin biosynthetic genes, which are the main *S. scabiei* virulence determinants (1, 22, 31). Cellobiose, however, locks both morphogenesis and secondary metabolism (31), possibly by affecting the production of a subtilase-like protease inhibitor (this work). Cellobiose, in maintaining *S. scabies* in primary metabolism, impaired the production of secondary metabolites such as thaxtomins and consequently, only a small quantity of thaxtomins is produced. In the presence of suberin only (Figure 2.3C), cellulases are produced but in the absence of accessible cellulose, cellobiose is not produced. As the thaxtomins biosynthetic genes inducer is lacking, thaxtomin biosynthesis is low, relying only on signals promoting morphogenesis and secondary metabolism. In the presence of both suberin and cellulose (Figure 2.3B), suberin may have a dual role in the onset of *S. scabiei* virulence. It may first stimulate the production of cellobiose, the transcriptional inducer of the thaxtomin biosynthetic genes, by stimulating cellulase activity (this work) and the consequent release of cellobiose from cellulose. Secondly, it may inhibit the effect of cellobiose on secondary metabolism by acting as a signal molecule for morphogenesis, thereby promoting the production of secondary metabolites such as thaxtomins.



**Figure 2. 3. Model of the onset of *Streptomyces scabiei* virulence mechanism by both cellulose and suberin.**

In the presence of cellulose only (A) or suberin only (C), the thaxtomin biosynthetic genes are only weakly expressed. In the first case, cellulases that cleave cellulose to release cellobiose are produced in low amounts. The liberated cellobiose acts as inducer of the thaxtomins biosynthetic genes. However, in the absence of an environmental signal that triggers secondary metabolism, cellobiose and/or cellulose locks *S. scabiei* in primary metabolism possibly by allowing the production of a subtilase protease inhibitor and thus limiting the production of secondary metabolites such as thaxtomins. In the presence of suberin only (C), secondary metabolism is promoted and cellulases are synthesized whereas cellobiose, the inducer of the thaxtomin biosynthetic genes is not produced due to the absence of cellulose. In the presence of both cellulose and suberin (B), the thaxtomin biosynthetic genes are highly expressed. Suberin and cellulose promote cellulase activity and cellobiose released from cellulose induces the thaxtomin biosynthetic genes. Suberin also triggers differentiation and secondary metabolism overcoming the action of cellulose and cellobiose.

## Acknowledgements

This work was supported by grants #018602 and #157930 from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

## References

1. Beauséjour, J., C. Goyer, J. Vachon, and C. Beaulieu. 1999. Production of thaxtomin A by *Streptomyces scabies* strains in plant extract containing media. *Can. J. Microbiol.* 45:764–768.
2. Bendtsen, J.D., L. Kiemer, A. Fausbøll, and S. Brunak. 2005. Non-classical protein secretion in bacteria. *BMC Microbiol.* 5:58.
3. Bendtsen, J.D., H. Nielsen, D. Widdick, T. Palmer, and S. Brunak. 2005. Prediction of twin-arginine signal peptides. *BMC Bioinformatics* 6:167.
4. Bernards, M.A., and F.A. Razem. 2001. The poly(phenolic) domain of potato suberin: A non-lignin cell wall bio-polymer. *Phytochemistry* 57:1115–1122.
5. Bernards, M.A. 2002. Demystifying suberin. *Can. J. Bot.* 80:227–240.
6. Blakeney, A.B., P.J. Harris, R.J. Henry, and B.A. Stone. 1983. A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydr. Res.* 113: 291–300.
7. Bradford, M.M. 1976 A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248–254.
8. Chater, K.F., S. Biró, K.J. Lee, T. Palmer, and H. Schrempf. 2010. The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol. Rev.* 34:171–198.
9. Chellapandi, P., and H.M. Jani. 2008. Production of endoglucanase by the native strains of *Streptomyces* isolates in submerged fermentation. *Braz. J. Microbiol.* 39:122–127.
10. Claudel-Renard, C., C. Chevale, T. Faraut, and D. Kahn. 2003. Enzyme-specific profiles for genome annotation: PRIAM. *Nucleic Acids Res.* 31:6633–6639.
11. Conforth, D.M., and K.R. Foster. 2013. Competition sensing: the social side of bacterial stress responses. *Nat. Rev. Microbiol.* 11:285–293.
12. Faucher, E., T. Savard, and C. Beaulieu. 1992. Characterization of actinomycetes isolated from common scab lesions on potato tubers. *Can. J. Plant Pathol.* 14:197–202.

13. Faucher, E., E. Paradis, C. Goyer, N.C. Hodge, R. Hogue, R.E. Stall, and C. Beaulieu. 1995. Characterization of *Streptomyces* causing deep-pitted scab of potato in Quebec, Canada. *Int. J. Syst Bacteriol.* 45:222–225.
14. Francis, I.M., S. Jourdan, S. Fanara, R. Loria, and S. Rigali. 2015. The cellobiose sensor CebR is the gatekeeper of *Streptomyces scabies* pathogenicity. *mBio*, 6:e02018-14.
15. Godden, B., T. Legon, P. Helvestein, and M. Pennickx. 1989. Regulation of the production of hemicellulolytic and cellulolytic enzymes by a *Streptomyces* sp. growing on lignocellulose. *J. Gen. Microbiol.* 135:285–292.
16. Golba, B., D. Treutter, and A. Kollar. 2012. Effects of apple (*Malus × domestica* Borkh.) phenolic compounds on proteins and cell wall-degrading enzymes of *Venturia inaequalis*. *Trees–Struct. Funct.* 26:131–139.
17. Goyer, C., J. Vachon, and C. Beaulieu. 1998. Pathogenicity of *Streptomyces scabies* mutants altered in thaxtomin A production. *Phytopathology* 88:442–445.
18. Harchand, R.K., and S. Singh. 2001. Induction of cellulases in *Streptomyces albaduncus* by different substrates. *Indian J. Microbiol.* 41:45–49.
19. Healy, F.G., M. Wach, S.B. Krasnoff, D.M. Gibson, and R. Loria. 2000. The txtAB genes of the plant pathogen *Streptomyces acidiscabies* encode a peptide synthetase required for phytotoxin thaxtomin A production and pathogenicity. *Mol. Microbiol.* 38:794–804.
20. Hill, J., and G. Lazarovits. 2005. A mail survey of growers to estimate potato common scab prevalence and economic loss in Canada. *Can. J. Plant Pathol.* 27:46–52.
21. Hodgson, D.A. 2000. Primary metabolism and its control in *Streptomyces*: A most unusual group of bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* 42:47–238.
22. Johnson, E.G., M.V. Joshi, D.M. Gibson, and R. Loria. 2007. Cello-oligosaccharides released from host plants induce pathogenicity in scab-inducing *Streptomyces* species. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 71:18–25.
23. Joshi, M.V., D.R.D. Bignell, E.G. Johnson, J.P. Sparks, D.M. Gibson, and R. Loria. 2007. The AraC/XylS regulator TxtR modulates thaxtomin biosynthesis and virulence in *Streptomyces scabies*. *Mol. Microbiol.* 66:633–642.

24. Käll, L., A. Krogh, and E.L.L. Sonnhammer. 2007. Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction-the Phobius web server. *Nucleic Acids Res.* 35:429–432.
25. Kanehisa, M., S. Goto, S. Kawashima, Y. Okuno, and M.Hattori. 2004. The KEGG resource for deciphering the genome. *Nucleic Acids Res.* 32:D277–D280.
26. Khatri, B.B., R.S. Tegg, P.H. Brown, and C.R. Wilson. 2011. Temporal association of potato tuber development with susceptibility to common scab and *Streptomyces scabiei*-induced responses in the potato periderm. *Plant Pathol.* 60:776–786.
27. Kieser, T., M.J. Bibb, M.J. Buttner, K.F. Chatter, and D.A. Hopwood. 2000. Practical *Streptomyces* genetics. John Innes Foundation, Norwich, UK.
28. Kolattukudy, P.E., and V.P. Agrawal. 1974. Structure and composition of aliphatic constituents of potato tuber skin suberin. *Lipids* 9:682–691.
29. Komeil, D., A.-M. Simao-Beaunoir, and C. Beaulieu. 2013. Detection of potential suberinase-encoding genes in *Streptomyces scabiei* strains and other actinobacteria. *Can. J. Microbiol.* 59:294–303.
30. Komeil, D., R. Padilla-Reynaud, S. Lerat, A.-M. Simao-Beaunoir, and C. Beaulieu. 2014. Comparative secretome analysis of *Streptomyces scabiei* during growth in the presence or absence of potato suberin. *Proteome Sci.* 12:35.
31. Lerat, S., A.-M. Simao-Beaunoir, R. Wu, N. Beaudoin, and C. Beaulieu. 2010. Involvement of the plant polymer suberin and the disaccharide cellobiose in triggering thaxtomin A biosynthesis, a phytotoxin produced by the pathogenic agent *Streptomyces scabies*. *Phytopathology* 100:91–96.
32. Lerat, S., M. Forest, A. Lauzier, G. Grondin, S. Lacelle, and C. Beaulieu. 2012. Potato suberin induces differentiation and secondary metabolism in the genus *Streptomyces*. *Microbes Environ.* 27:36–42.
33. Lever, M. 1972. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. *Anal. Biochem.* 47:273–279.
34. Lombard, V., H. Golaconda Ramulu, E. Drula, P.M. Coutinho, and B. Henrissat. 2014. The carbohydrate-active enzymes database CAZy in 2013. *Nucleic Acids Res.* 42D1:D490–D495.

35. Loria, R., R.A. Bukhalid, B.A. Fry, and R.R. King. 1997. Plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. *Plant Dis.* 81:836–846.
36. MacKenzie, C.R., G.B. Patel, and D. Bilous. 1987. Factors involved in hydrolysis of microcrystalline cellulose by *Acetivibrio cellulolyticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:304–308.
37. Martins, I., D.O. Hartmann, P. Alves, et al. 2014. Elucidating how the saprophytic fungus *Aspergillus nidulans* uses the plant polyester suberin as carbon source. *BMC Genomics* 15:613.
38. McQueen, D.A.R., and J.L. Schottel. 1987. Purification and characterization of a novel extracellular esterase from pathogenic *Streptomyces scabiei* that is inducible by zinc. *J. Bacteriol.* 169:1967–1971.
39. Moire, L., A. Schmutz, A. Buchala, B. Yan, R.E. Stark, and U. Ryser. 1999. Glycerol is a suberin monomer. New experimental evidence for an old hypothesis. *Plant Physiol.* 119:1137–1146.
40. Moraïs, S., Y. Barak, Y. Hadar, D.B. Wilson, Y. Shoham, R. Lamed, and E.A. Bayer. 2011. Assembly of xylanases into designer cellulosomes promotes efficient hydrolysis of the xylan component of a natural recalcitrant cellulosic substrate. *mBio* 2.
41. Neilson, K.A., N.A. Ali, S. Muralidharan, M. Mirzaei, M. Mariani, G. Assadourian, A. Lee, S.C. Van Sluyter, and P.A. Haynes. 2011. Less label, more free: approaches in label-free quantitative mass spectrometry. *Proteomics* 11:535–553.
42. Ofong, A.U., and R.B. Pearce. 1994. Suberin degradation by *Rosellinia desmazieresii*. *Eur. J. For. Path.* 24:316–322.
43. Petersen, T.N., S. Brunak, G. von Heijne, and H. Nielsen. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods* 8:785–786.
44. Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29:2002–2007.
45. Rose, R.W., T. Brüser, J.C. Kissinger, and M. Pohlschröder. 2002. Adaptation of protein secretion to extremely high salt concentrations by extensive use of the twin arginine translocation pathway. *Mol. Microbiol.* 5:943–950.



46. Saritha, M., A. Arora, S. Surender, and N. Lata. 2013. *Streptomyces griseorubens* mediated delignification of paddy straw for improved enzymatic saccharification yields. *Bioresour. Technol.* 135:12–17.
47. Scheible, W.-R., B. Fry, A. Kochevenko, D. Schindelasch, L. Zimmerli, S. Somerville, R. Loria, and C.R. Somerville. 2003. An *Arabidopsis* mutant resistant to thaxtomin A, a cellulose synthesis inhibitor from *Streptomyces* species. *Plant Cell* 15:1781–1794.
48. Shao, D., W.D. Dunlop, E.M.K. Lui, and M.A. Bernards. 2008. Immunostimulatory and anti-inflammatory polysaccharides from *Tripterygium wilfordii*: comparison with organic extracts. *Pharm. Biol.* 46:8–15.
49. Singhai, P.K., B.K. Sarma, and J.S. Srivastava. 2011. Phenolic acid content in potato peel determines natural infection of common scab caused by *Streptomyces* spp. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27:1559–1567.
50. Tatusov, R.L., E.V. Koonin, and D.J. Lipman. 1997. A genomic perspective on protein families. *Science* 278:631–637.
51. Thierie, J., and M.J. Pennickx. 2007. Modeling of competitive mutualistic relationships. Application to cellulose degradation by *Streptomyces* sp. stains. *Curr. Microbiol.* 55:507–511.
52. Tsujiyama, S.-I, K. Sumida, and H. Ueno. 2001. Influence of vanillin on the production of cellulolytic and xylanolytic enzymes from a wood-rotting fungus, *Corius versicolor*. *Mycoscience* 41:527–532.
53. van Munster, J.M., P. Daly, S. Delmas, et al. 2014. The role of carbon starvation in the induction of enzymes that degrade plant-derived carbohydrates in *Aspergillus niger*. *Fungal Genet. Biol.* 72:34–47.
54. Větrovský, T., K.T. Steffen, and P. Baldrian. 2014. Potential of cometabolic transformation of polysaccharides and lignin in lignocellulose by soil *Actinobacteria*. *PLoS One* 9.
55. Zeng, J., D. Singh, D.D. Laskar, and S. Chen. 2013. Degradation of native wheat straw lignin by *Streptomyces viridosporus* T7A. *Int. J. of Environ. Sci. Technol.* 10:165–174.

**Table S2. Proteins produced by *Streptomyces scabiei* EF-35.**

Uniprot accession number	Corresponding gene in <i>S.</i> <i>scabiei</i> 87.22 genome		Putative function	Predicted cellular localization	Normalized spectral abundance factor (%)	
					CM+C	CM+C+S
Amino acid transport and metabolism						
C9YYT5	SCAB_8041		Amidohydrolase	Extracellular	ND <sup>a</sup>	0.25
C9Z082	SCAB_8301		Protease	Extracellular	0.15	ND
C9Z0B6	SCAB_8661		Protease	Extracellular	0.31	ND
C9Z544	SCAB_11801		Peptidase	Extracellular	0.24	ND
C9ZGG7	SCAB_18081		γ-glutamyltranspeptidase	Extracellular	0.15	0.47
C9Z204	SCAB_24891		Glutamate uptake system binding subunit	Extracellular	1.85	2.06
C9Z5D4	SCAB_27411		Oligopeptide-binding transport system protein	Extracellular	0.25	ND

C9Z6U2	SCAB_27811	Xaa-Pro dipeptidyl-peptidase	Extracellular	0.17	ND
C9YXR8	SCAB_37611	Aminopeptidase	Extracellular	0.48	1.98
C9ZC37	SCAB_46731	Xaa-Pro aminopeptidase	Intracellular	0.15	0.19
C9ZH11	SCAB_49881	Muramoyltetrapeptide carboxypeptidase	Extracellular	0.35	ND
C9YTK4	SCAB_51101	Phosphoserine aminotransferase	Intracellular	D <sup>b</sup>	0.38
C9YXZ5	SCAB_53981	Peptidase	Extracellular	ND	0.05
C9ZAW6	SCAB_62471	Aminopeptidase	Extracellular	0.13	0.78
C9YTV5	SCAB_67441	Muramoyltetrapeptide carboxypeptidase	Extracellular	0.27	ND
C9YWP0	SCAB_68931	Branched-chain amino acid ABC transporter substrate-binding protein	Extracellular	1.25	0.81
C9YZP9	SCAB_70761	Solute-binding protein	Extracellular	1.17	0.64
C9Z1E7	SCAB_72231	Serine protease	Extracellular	0.27	0.57
C9ZCL9	SCAB_78431	Tripeptidylaminopeptidase	Extracellular	ND	0.24

C9Z058	SCAB_84971	Amidase	Extracellular	ND	0.09
--------	------------	---------	---------------	----	------

Carbohydrate transport and metabolism

C9ZBE6	SCAB_0631	$\alpha$ -L-fucosidase	Extracellular	ND	0.13
--------	-----------	------------------------	---------------	----	------

C9YYV2	SCAB_3881 or SCAB_22931	Arabinofuranosidase	Extracellular	ND	0.68
--------	----------------------------	---------------------	---------------	----	------

C9YUC5	SCAB_4961	Glucuronoarabinoxylan endo-1,4- $\beta$ - xylanase	Extracellular	ND	0.49
--------	-----------	---	---------------	----	------

C9YUG2	SCAB_5351	ABC-type sugar transport system	Extracellular	1.27	0.71
--------	-----------	---------------------------------	---------------	------	------

C9YVN3	SCAB_5851	Glycosyl hydrolase	Extracellular	ND	0.17
--------	-----------	--------------------	---------------	----	------

C9YVP5	SCAB_5981	Cellulase B precursor CelB	Extracellular	D	0.94
--------	-----------	----------------------------	---------------	---	------

C9YVP9	SCAB_6021	Endo $\beta$ -1,4-xylanase	Extracellular	0.25	1.37
--------	-----------	----------------------------	---------------	------	------

C9Z0D5	SCAB_8871	Cellulase	Extracellular	0.12	0.38
--------	-----------	-----------	---------------	------	------

C9Z1T6	SCAB_9291 or SCAB_91051	Lactonase	Extracellular	ND	0.26
--------	----------------------------	-----------	---------------	----	------

C9Z1U5	SCAB_9381	Exo- $\alpha$ -sialidase	Extracellular	ND	0.53
--------	-----------	--------------------------	---------------	----	------

C9Z507	SCAB_11431	Glycosyl hydrolase	Extracellular	0.22	1.11
--------	------------	--------------------	---------------	------	------

C9Z878	SCAB_13491	Glucan endo-1,3- $\beta$ -D-glucosidase	Extracellular	ND	0.13
C9ZD50	SCAB_16431	Cellulase CelA1	Extracellular	1.86	3.06
C9ZD59	SCAB_16521	Arabinofuranosidase	Extracellular	ND	1.81
C9ZD61	SCAB_16551	Mannosidase	Extracellular	ND	0.11
C9ZEP9	SCAB_17001	Cellulase	Extracellular	D	1.51
C9ZEQ0	SCAB_17011	Cellulase	Extracellular	0.18	1.58
C9ZEQ1	SCAB_17021	Cellulase	Extracellular	ND	1.47
C9YT63	SCAB_19561	$\beta$ -fructofuranosidase	Extracellular	ND	0.23
C9YUL1	SCAB_19941	Arabinofuranosidase	Extracellular	0.18	0.36
C9YVX8	SCAB_21021	Xylose ABC transporter substrate-binding protein	Extracellular	0.49	ND
C9YUZ2	SCAB_36371	Xylanase/cellulase	Extracellular	0.19	1.77
C9YUZ7	SCAB_36421	$\beta$ -xylosidase	Intracellular	ND	0.10
C9YW88	SCAB_37051	Cellulase/xylanase	Extracellular	0.46	2.06
C9Z5F4	SCAB_42381	ABC transporter substrate-binding protein	Extracellular	0.26	ND

C9Z5L1	SCAB_42951	Glucose / Sorbosone dehydrogenase	Extracellular	0.93	9.47
C9Z737	SCAB_43661	Galactan endo-1.6- $\beta$ -galactosidase	Extracellular	D	0.49
C9YTK2	SCAB_51081	Cellulase	Extracellular	0.22	0.75
C9YY37	SCAB_54441	Enolase	Intracellular	0.18	ND
C9Z2N2	SCAB_57161	Endo- $\beta$ -1,6-galactanase	Extracellular	ND	0.21
C9Z451	SCAB_57751	Cellobiose-binding transport system associated	Extracellular	1.46	1.72
C9ZDW4	SCAB_63891	ABC-type xylose transport system, periplasmic	Extracellular	1.05	0.19
C9ZFW2	SCAB_66021	$\beta$ -xylosidase	Extracellular	ND	0.32
C9ZFW3	SCAB_66031	Arabinofuranosidase	Extracellular	D	1.09
C9YYF0	SCAB_70591	Pectate lyase	Extracellular	ND	0.72
C9Z2V1	SCAB_72711	Endo- $\beta$ -1,4-xylanase	Extracellular	D	0.62
C9Z2W0	SCAB_72801	Glycosyl hydrolase	Extracellular	ND	1.05
C9Z4J7	SCAB_74141	$\alpha$ -N-furanosidase	Extracellular	ND	0.43
C9Z623	SCAB_74681	Licheninase	Extracellular	ND	0.44

C9ZAZ8	SCAB_77201	Glycosyl hydrolase	Extracellular	ND	2.33
C9ZB17	SCAB_77391	Cellulose 1,4- $\beta$ -cellobiosidase	Extracellular	ND	0.22
C9ZB22	SCAB_77441	$\alpha$ -arabinanase	Extracellular	0.13	0.24
C9ZCR4	SCAB_78891	Glycosyl hydrolase	Extracellular	ND	0.17
C9ZE74	SCAB_79011	Acetyl-xylan esterase	Extracellular	ND	0.80
C9ZE94	SCAB_79241	Arabinofuranosidase	Extracellular	0.26	1.16
C9ZE95	SCAB_79251	Xylanase A	Extracellular	1.84	10.25
C9ZEC5	SCAB_79561	Glycosyl hydrolase	Extracellular	ND	0.30
C9ZFY5	SCAB_79861	Xylose isomerase	Intracellular	ND	0.70
C9YU29	SCAB_82021	$\beta$ -mannosidase	Extracellular	ND	0.51
C9Z1I5	SCAB_85231	Chitinase	Extracellular	0.44	0.54
C9Z351	SCAB_86311	Cellulase	Extracellular	ND	0.30
C9Z804	SCAB_89741	Cellulose-binding protein	Extracellular	0.74	1.05
C9Z9L5	SCAB_90081	Cellulase $\beta$ precursor	Extracellular	0.30	D
C9Z9L6	SCAB_90091	Cellulase	Extracellular	0.34	2.38
C9Z9L7	SCAB_90101	Cellulase	Extracellular	0.19	0.48

Cell envelope biogenesis, outer membrane

C9Z1V1	SCAB_9441	Sugar isomerase	Intracellular	ND	0.08
C9Z234	SCAB_25191	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase	Intracellular	ND	0.38
C9YT92	SCAB_34981	Lipoprotein	Extracellular	1.71	2.24
C9YUU8	SCAB_35931	Glycosyl hydrolase	Extracellular	0.37	ND
C9YXT6	SCAB_37811	Membrane protein	Extracellular	0.97	ND
C9Z8V2	SCAB_45141	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	Extracellular	ND	0.45
C9YWP7	SCAB_69011	Lytic transglycosylase	Extracellular	0.45	0.34

Energy production and conversion

C9Z8E8	SCAB_28761	ATP synthetase $\beta$ subunit	Intracellular	0.49	0.22
C9Z8F0	SCAB_28781	ATP synthase $\alpha$ subunit	Intracellular	0.51	0.14
C9YTG2	SCAB_35681	Malate dehydrogenase	Intracellular	0.91	0.62
C9YTR7	SCAB_67061	Dihydrolipoyl dehydrogenase	Intracellular	3.38	3.91
C9YTU0	SCAB_67291	Cytochrome C oxidase subunit II	Extracellular	0.44	ND



C9YTU6	SCAB_67351	Cytochrome C heme-binding subunit	Extracellular	0.83	ND
C9YVE7	SCAB_68221	Nitrate reductase	Extracellular	0.24	ND
C9YY62	SCAB_69701	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Intracellular	ND	0.14
C9ZE86	SCAB_79151	Cytokinin dehydrogenase	Extracellular	ND	1.20

Unknown function

C9YUA5	SCAB_4761		Extracellular	0.70	D
C9YVL7	SCAB_5681		Extracellular	ND	0.40
C9YX78	SCAB_6661		Extracellular	0.78	ND
C9YYN8	SCAB_7551		Extracellular	0.62	D
C9Z516	SCAB_11521		Extracellular	0.76	ND
C9Z6Q2	SCAB_12841		Extracellular	ND	0.22
C9ZGH2	SCAB_18141		Intracellular	ND	0.32
C9YVU0	SCAB_20641		Extracellular	ND	0.20
C9Z3S4	SCAB_26361		Extracellular	1.31	ND
C9Z704	SCAB_28451		Extracellular	0.78	ND

C9ZBP7	SCAB_30501	Intracellular	0.20	ND
C9ZF64	SCAB_33511	Intracellular	0.59	ND
C9ZGQ1	SCAB_33981	Extracellular	2.41	2.48
C9YTD0	SCAB_35361	Extracellular	0.75	1.51
C9YTG1	SCAB_35671	Extracellular	0.29	ND
C9YUT0	SCAB_35731	Extracellular	1.17	1.44
C9YW90	SCAB_37071	Extracellular	4.45	ND
C9YZD0	SCAB_39131	Extracellular	0.65	ND
C9Z0Q1	SCAB_39341	Intracellular	0.13	D
C9Z0X0	SCAB_40041	Extracellular	1.04	D
C9Z759	SCAB_43891	Extracellular	1.10	0.45
C9Z765	SCAB_43951	Extracellular	D	0.38
C9Z7A3	SCAB_44341	Extracellular	0.78	0.27
C9Z8P6	SCAB_44591	Extracellular	0.27	ND
C9ZC25	SCAB_46611	Extracellular	1.27	ND
C9ZC26	SCAB_46621	Extracellular	0.45	ND

C9YV41	SCAB_52001	Extracellular	1.17	1.24
C9YY35	SCAB_54421	Extracellular	0.55	ND
C9Z2I9	SCAB_56741	Extracellular	0.83	ND
C9ZDY2	SCAB_64081	Extracellular	2.78	1.72
C9ZHF3	SCAB_66761	Extracellular	1.09	ND
C9YTT6	SCAB_67251	Extracellular	0.17	0.28
C9Z1G8	SCAB_72441	Extracellular	ND	0.17
C9Z4J0	SCAB_74081	Extracellular	ND	1.06
C9Z4K8	SCAB_74261	Extracellular	1.34	ND
C9Z9C8	SCAB_76271	Intracellular	0.95	0.44
C9YU74	SCAB_82491	Extracellular	0.17	ND
C9Z7Y9	SCAB_89571	Extracellular	0.47	ND
C9Z9T4	SCAB_90811	Extracellular	1.70	0.79
C9Z9U4	SCAB_90901	Extracellular	D	0.64

General function prediction only

C9Z0C3	SCAB_8741	ABC transporter substrate-binding protein	Extracellular	0.18	ND
C9Z0C9	SCAB_8801	Subtilase-type protease inhibitor	Extracellular	26.02	1.15
C9Z3C3	SCAB_10031	Cucumisin	Extracellular	0.44	ND
C9Z862	SCAB_13321	X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase	Extracellular	ND	0.30
C9Z871	SCAB_13411	Oxidoreductase	Extracellular	D	0.57
C9YVV0	SCAB_20741	Superoxide dismutase	Extracellular	0.53	ND
C9ZF82	SCAB_33691	Transglycosylase domain-containing protein	Extracellular	1.42	D
C9ZGS4	SCAB_34211	Galactose oxidase	Extracellular	ND	0.09
C9ZGU9	SCAB_34471	Transferase lipoprotein	Extracellular	0.27	ND
C9Z5M7	SCAB_43121	Serine/threonine protein kinase	Extracellular	0.08	0.10
C9Z760	SCAB_43901	Secreted hydrolase	Extracellular	0.79	0.72
C9Z770	SCAB_44001	Protein-lysine 6-oxidase	Extracellular	0.26	ND
C9ZAI3	SCAB_45561	Serine/threonine protein kinase	Extracellular	0.36	D

C9ZAN4	SCAB_46111	Single-stranded DNA-binding protein	Extracellular	D	0.61
C9Z2V8	SCAB_72781	Penicillin acylase	Extracellular	ND	0.44
C9ZE96	SCAB_79261	Feruloyl esterase	Extracellular	0.63	1.88
C9YU69	SCAB_82441	Feruloyl esterase	Extracellular	ND	0.13

#### Inorganic ion transport and metabolism

C9YUK3	SCAB_19841	Aliphatic sulfonate ABC transporter substrate-binding protein	Extracellular	1.80	3.50
C9ZFJ5	SCAB_49311	High-affinity phosphate-binding protein	Extracellular	6.65	2.76
C9Z473	SCAB_57981	Protein DesF, iron transport system	Extracellular	0.38	D
C9Z7C8	SCAB_59731	Superoxide dismutase	Intracellular	D	0.28
C9ZAS1	SCAB_61981	ABC-transporter metal-binding lipoprotein	Extracellular	1.10	ND
C9YTX8	SCAB_67681	Bacterioferritin	Intracellular	ND	0.35
C9YVE4	SCAB_68191	Alkaline phosphatase	Intracellular	ND	0.18

#### Lipid transport and metabolism

C9ZG71	SCAB_3021	Triacylglycerol lipase	Extracellular	0.67	0.55
C9Z6Y6	SCAB_28271	Cholesterol esterase	Extracellular	0.41	0.75
C9YTK3	SCAB_51091	Esterase-lipase	Extracellular	ND	0.57
C9YY49	SCAB_54571	Acetyl-CoA C-acyltransferase	Intracellular	ND	0.16
C9Z5Z2	SCAB_74351	Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	Extracellular	D	0.36
C9ZCR0	SCAB_78851	Sphingolipid ceramide N-deacylase	Extracellular	ND	0.15

#### Nucleotide transport and metabolism

C9ZGX4	SCAB_49491	5'-nucleotidase	Extracellular	ND	0.21
C9Z7F8	SCAB_60011	Nucleoside diphosphate kinase	Intracellular	D	1.12
C9YVK8	SCAB_68841	5'-nucleotidase	Extracellular	ND	0.12
Posttranslational modification, protein turnover, chaperones					
C9Z578	SCAB_26841	Serine protease	Extracellular	0.35	ND
C9YUY5	SCAB_36301	10 kDa chaperonin	Intracellular	2.00	ND

C9Z5G9	SCAB_42541	Chaperone protein DnaK	Intracellular	0.21	D
C9ZC44	SCAB_46811	Protease	Extracellular	0.28	ND
C9ZH64	SCAB_50441	60 kDa chaperonin	Intracellular	0.28	D
C9Z989	SCAB_61561	Chaperone protein DnaJ	Intracellular	0.15	ND
C9ZAQ3	SCAB_61791	Protein-arginine deiminase	Extracellular	0.14	ND
Morphological differentiation					
C9ZD97	SCAB_31531	BldKB-like transport system extracellular solute-binding protein	Intracellular	0.29	ND
Signal transduction mechanism					
C9Z0L9	SCAB_24621	TerD-like stress protein	Extracellular	D	0.51
C9YXX5	SCAB_38231	Cold shock protein	Extracellular	1.67	ND
C9ZH47	SCAB_50261	TerD-like stress protein	Intracellular	0.50	ND
C9ZE07	SCAB_64331	TerD-like stress protein	Intracellular	0.80	0.34
C9ZHS9	SCAB_81661	TerD-like stress protein	Intracellular	1.90	0.76

Coenzyme metabolism

C9Z1Y4	SCAB_9771	Cobalamin biosynthesis protein cobN	Intracellular	ND	0.26
--------	-----------	-------------------------------------	---------------	----	------

Defense mechanism and virulence

C9ZAA4	SCAB_29931	Superoxide dismutase	Intracellular	D	0.45
--------	------------	----------------------	---------------	---	------

C9Z785	SCAB_44161	$\beta$ -lactamase	Intracellular	0.17	0.68
--------	------------	--------------------	---------------	------	------

Translational, ribosomal structure and biogenesis

C9Z240	SCAB_25251	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	Intracellular	0.25	0.34
--------	------------	--	---------------	------	------

C9Z3N7	SCAB_25991	Ribosome-recycling factor	Intracellular	0.76	ND
--------	------------	---------------------------	---------------	------	----

C9YW92	SCAB_37091	Elongation factor Tu	Intracellular	0.09	ND
--------	------------	----------------------	---------------	------	----

C9YWQ2	SCAB_69061	30S ribosomal protein S1	Intracellular	D	0.12
--------	------------	--------------------------	---------------	---	------

---

Secretome of *S. scabiei* EF-35 during growth in control medium supplemented with microcrystalline cellulose (CM+C) or control medium supplemented with microcrystalline cellulose and suberin (CM+C+S)



### CHAPITRE 3

## COMPARAISON DE L'HABILETÉ CELLULOLYTIQUE D'ESPÈCES DE *STREPTOMYCES* PATHOGÈNES ET NON PATHOGÈNES EN RÉPONSE AU CELLOBIOSE ET À LA SUBÉRINE DE POMME DE TERRE.

#### 3.1. Préambule.

Les *Streptomyces* pathogènes responsables de la maladie de la gale commune de la pomme de terre rencontrent lors de la colonisation de leur hôte, deux composantes du périderme, la subérine et la cellulose. Il a été démontré que la subérine induisait mieux la production de cellulases chez *Streptomyces scabiei* EF-35 que le substrat des enzymes, la cellulose et il a été alors proposé que le cellobiose n'était pas un bon inducteur de l'activité chez *S. scabiei* (voir section 2.2). Dans ce travail, l'effet inducteur du cellobiose ou de la subérine sur l'activité cellulolytique a été testé chez différentes espèces de *Streptomyces* pathogènes et non pathogènes. La subérine est le meilleur inducteur de la synthèse des cellulases que le cellobiose chez les deux souches pathogènes de *Streptomyces scabiei* testées. Cependant, l'agent pathogène *Streptomyces acidiscabies* et l'agent saprophyte *Streptomyces coelicolor*, ont le cellobiose comme inducteur des enzymes cellulolytiques. Finalement, la souche pathogène Car8 de *Streptomyces turgidiscabies* présente une activité similaire en présence des deux composés. L'ajout de subérine dans un milieu contenant du cellobiose se traduisait par une augmentation de la production générale de cellulases par *S. scabiei*, mais la production de cellulases était inférieure à ce qui avait été rapporté précédemment dans un milieu ne contenant que de la subérine. *Streptomyces scabiei* semble donc mieux adapté que les autres espèces de *Streptomyces* à dégrader le matériel cellulosique encastré dans les parois subérisées du périderme.

Les travaux effectués dans le cadre du chapitre III sont présentés sous forme d'un article dans la section 3.2. Cet article intitulé « Comparative cellulolytic ability of pathogenic and non-pathogenic *Streptomyces* species in response to cellobiose and potato suberin» est signé par R. Padilla-Reynaud, M. Khalil, S. Lerat, A.-M. Simao-Beaunoir et C. Beaulieu et sera soumis au J. Can. Microbiol.

La contribution de chaque auteur dans l'article est comme suit : j'ai effectué l'ensemble des expériences à l'exception des travaux d'expression génétique qui ont été effectués par M. Khalil et S. Lerat. Les travaux de protéomique ont été effectués sous la supervision de A.-M. Simao-Beaunoir. J'ai rédigé l'article en collaboration avec les autres co-auteurs. L'ensemble des travaux a été supervisé par C. Beaulieu.

3.2 Comparative cellulolytic ability of pathogenic and non-pathogenic *Streptomyces* species in response to cellobiose and potato suberin.

Rebeca Padilla-Reynaud, Mario Khalil, Sylvain Lerat, Anne-Marie Simao-Beaunoir and Carole Beaulieu\*

Centre SÈVE, Département de Biologie, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1K 2R1

\*Corresponding author:

Dr. Carole Beaulieu

Phone: 819-821-8000 ext. 62997

Fax: 819-821-8049

E-mail: [Carole.Beaulieu@USherbrooke.ca](mailto:Carole.Beaulieu@USherbrooke.ca)

**Abstract:** In the presence of two components of the potato tuber periderm, cellulose and suberin, *Streptomyces scabiei*, a potato common scab-inducing bacterium, has been previously shown to produce higher amount of cellulases than it did in the presence of either cellulose or suberin alone. In this study, it was shown that suberin was a better inducer of cellulase biosynthesis than cellobiose in *S. scabiei*. Both cellulase activity and cellulase gene expression were higher in the presence of suberin in this species. In contrast, another common scab-inducing species, *Streptomyces acidiscabies*, as well as a non-pathogenic *Streptomyces coelicolor* strain, exhibited higher cellulase activity in the presence of cellobiose; while the plant pathogenic *Streptomyces turgidiscabies* showed similar activity in both media. When cellobiose and suberin were added in combination in *S. scabiei* cultures, cellulase activity slightly increased compared to the one associated with cellobiose-containing medium, but the cellulase activity was still higher in the medium containing suberin alone. Accordingly, proteomics analysis of *S. scabiei* strain EF-35 secretome revealed that the normalized spectral abundance factor (NSAF) for the cellulase enzymes was higher in a medium containing both cellobiose and suberin than cellobiose only. However, the NSAF recorded in the medium containing both cellobiose and suberin was lower than the one previously reported for a medium containing suberin only. *S. scabiei* thus appears to be better adapted for exploiting cellulosic material embedded in the recalcitrant suberized cell walls of its host, potato, than emergent common scab-inducing pathogens and saprophytic *Streptomyces* species.

**Keywords:** cellobiose, common scab, *Streptomyces scabiei*, suberin.

**Résumé :** En présence de deux composants du périderme des tubercules de pomme de terre, la cellulose et la subérine, chez *Streptomyces scabiei*, une bactérie induisant la gale commune, il a été préalablement montré qu'elle produisait une quantité de cellulases plus élevée qu'en présence de cellulose ou de subérine seulement. Dans cette étude, il est montré que la subérine était un meilleur inducteur de la biosynthèse de la cellulase que le cellobiose chez *S. scabiei*. L'activité des cellulases et l'expression des gènes de cellulases étaient plus élevées en présence de subérine dans cette espèce. En revanche, *Streptomyces acidiscabies*, ainsi qu'une souche non pathogène, *Streptomyces coelicolor*, présentent une activité cellulase plus élevée en présence de cellobiose ; tandis qu'un autre agent phytopathogène, *Streptomyces turgidiscabies*, présente une activité similaire dans les deux milieux. Lorsque le cellobiose et la subérine ont été ajoutés en combinaison dans le milieu de culture du *S. scabiei*, l'activité des cellulases a légèrement diminué par rapport à celle associée à un milieu contenant du cellobiose, mais l'activité cellulase était encore plus élevée dans le milieu contenant la subérine seulement. En conséquence, l'analyse protéomique du sécrétome du *S. scabiei* souche EF-35 a révélé que le facteur d'abondance spectrale normalisé (NSAF) pour les enzymes de cellulase était plus élevé dans un milieu contenant à la fois cellobiose et subérine que cellobiose seulement. Cependant, le NSAF enregistré dans un milieu contenant à la fois de le cellobiose et de la subérine était inférieur à celui rapporté précédemment pour un milieu contenant uniquement de la subérine. *S. scabiei* semble donc être le mieux adapté pour exploiter la matière cellulosique imbriquée dans les parois cellulaires subérisées récalcitrantes de son hôte, la pomme de terre, que les pathogènes émergents et les espèces de *Streptomyces* saprophytes.

**Mots-clés :** cellobiose, gale commune, *Streptomyces scabiei*, subérine.

## Introduction

Actinobacteria consist of a wide phylum of Gram-positive bacteria characterized by a genome with high guanine and cytosine content. Among actinobacteria, *Streptomyces* represents the largest genus. The bacterium grows a vegetative mycelium which will lead to an aerial branching hyphae called sporogenous hyphae and disperse through spores (Flärdh and Buttner, 2009). *Streptomyces* species play a significant role in the decomposition of the organic matter due to the production of a variety of extracellular enzymes including several glycosyl hydrolases such as cellulases and xylanases (Amore et al. 2012; Juturu and Wu 2014; Pinheiro et al. 2016). While most *Streptomyces* species are soil or aquatic saprophytic organisms, some rare species are plant pathogens. *Streptomyces scabiei*, having a worldwide distribution, is the main causal agent of potato common scab (Loria et al. 1997) but other emergent species, including *Streptomyces turgidiscabies* and *Streptomyces acidiscabies*, also cause the disease (Loria et al. 2006). Potato common scab is characterized by corky lesions on potato tubers. The essential determinants of virulence in common scab-causing bacteria are thaxtomins (Goyer et al., 1998), plant toxic secondary metabolites that inhibit cellulose biosynthesis (Fry and Loria, 2002 ; Scheible et al., 2003). Although the production of thaxtomins is essential for the development of the disease, other factors such as production of extracellular proteins can lead to the degradation of plant tissue and facilitate the infection (Beauséjour et al. 1999, Bignell et al. 2010).

Potato periderm is formed of three cell types: phellem, phellogen and phelloderm. The skin tuber, the outer part of the periderm, consists of layers of dead phellem cells. These dead cells are impregnated with suberin, a complex lipidic polymer recalcitrant to microbial degradation. *S. scabiei* exhibits, however, the ability to degrade this polymer (Beaulieu et al. 2016). When grown on suberin-enriched potato periderm, the largest part of *S. scabiei* secretome is composed of glycosyl hydrolases including several active cellulases (Komeil et al. 2013). Surprisingly,

suberin-enriched periderm was reported to be a better substrate for cellulase production than cellulose (Padilla-Reynaud et al. 2015). Both cellulase production and activity were, however, maximized when the pathogen was grown in the presence of both cellulose and suberin (Padilla-Reynaud et al. 2015) suggesting that cellobiose, the main degradation product of cellulose, is not the sole environmental signal triggering cellulase production.

In non-pathogenic *Streptomyces* species, cellulase biosynthesis is under the control of the repressor CebR (Marushima et al. 2009). In *S. scabiei*, this repressor was shown to be involved in pathogenicity by modulating thaxtomin synthesis (Francis et al. 2015). When bound to cellobiose, CebR is released from its binding sites located upstream the thaxtomin biosynthetic cluster and within their coding sequences allowing transcription of the thaxtomin biosynthetic (*txtA*, *txtB*) and regulatory genes (*txtR*) (Jourdan et al. 2016). Cellobiose interacts not only with CebR, it was identified as the inducer of the thaxtomin biosynthetic genes as it binds TxtR, the transcriptional activator of the thaxtomin biosynthetic gene cluster (Joshi et al. 2007). *S. scabiei* cellulases could thus be important for common scab-inducing *Streptomyces* species by providing cellobiose, the disaccharide that triggers thaxtomin production. Additional factors including glucose (Babcock et al. 1993), tryptophan (Legault et al. 2011), suberin (Lerat et al. 2010) and several Bld proteins (Bignell et al. 2014) were also shown to affect thaxtomin production.

In this study, the effect of cellobiose and suberin on both cellulase activity and transcription of cellulase-encoding genes was examined in three common scab-inducing species and in a nonpathogenic *Streptomyces* species. In addition, the protein composition of *S. scabiei* strain EF-35 secretome in media containing cellobiose or combining both cellobiose and suberin was determined by a proteomics approach.

## Materials and Methods

### Bacterial strain and growth conditions

Four common scab-inducing strains, *Streptomyces scabiei* strain EF-35 (Faucher et al. 1992), *S. scabiei* strain 87.22 (Bukhalid et al. 1998), *Streptomyces acidiscabies* strain ATCC 49003 (Lambert and Loria, 1989) and *Streptomyces turgidiscabies* strain Car8 (Miyajima et al. 1998), as well as a non-pathogenic strain *Streptomyces coelicolor* strain M145 (Bibb et al. 1977) were used in this study. Bacterial inoculum was prepared by inoculating approximately  $10^8$  spores in 25 mL of YME (4 g L<sup>-1</sup> of glucose, 4 g L<sup>-1</sup> of yeast extract and 10 g L<sup>-1</sup> of malt extract) and incubating the culture with shaking (250 rpm) at 30°C for 48 h. The bacterial cells were recovered by a 10 min centrifugation (3500 x g) for 10 min. The volume of the cell pellet was estimated and the cells were then resuspended in 5 volumes of saline (0.85% NaCl). This inoculum (200 µL) was transferred to 50 mL of a control medium (CM) composed of 0.5 g L<sup>-1</sup> L-asparagine, 0.5 g L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 10 mg L<sup>-1</sup> FeSO<sub>4</sub> and 0.05% (w/v) casein hydrolysate (Sigma-Aldrich) supplemented or not with 0.5% (w/v) cellobiose (Sigma-Aldrich) and/or with 0.1% (w/v) of suberin extracted from potato tubers as previously described (Padilla-Reynaud et al. 2015). Culture media were incubated with shaking (250 rpm) for 5 days at 30°C.

### Gene expression

Cellulase gene expression was determined by qRT-PCR as described by Padilla-Reynaud et al. (2015). Primers used for the gene expression experiment are listed in Table 3.1. Cycle threshold values were used to calculate relative gene expression according to C<sub>T</sub> method (Pfaffl, 2001) using *gyrA* as reference gene (Joshi et al. 2007).



**Table 3. 1. List of primers used in this study.**

Gene assignation	Bacterial species	Predicted function of the corresponding protein	Primer sets (5' to 3')
SCAB_24291	<i>S. scabiei</i>	Gyrase A ( <i>gyrA</i> )	For:GGACATCCAGACGCAGTACA Rev:CTCGGTGTTGAGCTTCTCCT
SCAB_5981	<i>S. scabiei</i>	Cellulase precursor CelB	B For:TGTTCAACGGGTGCCATTAC Rev:ACATAGCCGTACGAGATGCT
SCAB_16431	<i>S. scabiei</i>	Cellulase CelA1	For:CATGAACCAGGCGCAGATA Rev : CCATGTAGACCCAGGTGTTG
SCAB_17001	<i>S. scabiei</i>	Cellulase	For:TCGTCCAGCTGGTGATCTA Rev:GTCGATGTACTGCGTCTTGT
SCAB_17011	<i>S. scabiei</i>	Cellulase	For:GAGGCGTACAGCTACCTCCTGTG Rev:GTAGAAGGAGTTGGTCGGCTGGTC
SCAB_17021	<i>S. scabiei</i>	Cellulase	For:GACACCTACACCTGGAAGAAC Rev:CTTCTCCTTGCGGTTGAAGA

SCAB_36371	<i>S. scabiei</i>	Xylanase/Cellulase	For:CTGAGAAGCCCCGGGAAATC Rev:CACCCGTCACACACATGAA
SCAB_51081	<i>S. scabiei</i>	Cellulase	For:GGCATCAACTGGTTCGGTTTCGAG Rev:TGTTGTAGCCCAGCGACTTCATCT
SCAB_90081	<i>S. scabiei</i>	Cellulase precursor	B For:TACAACGGCTGCCACTAC Rev:CTCGCATAGCTGTAGGAGATAC
SCAB_90091	<i>S. scabiei</i>	Cellulase	For:AGGACAGCAGATACATCGAGGAGT Rev:TCAAGAAGATCGGCAACTGTGTCTG
SCAB_90101	<i>S. scabiei</i>	Cellulase	For:TCGAGTTGGTCGCTGAAATG Rev:AAGCGTGCCGTTGTAGTT
STRTUCAR8_5611	<i>S. turgidiscabies</i>	Gyrase A ( <i>gyrA</i> )	For:GAAGACGCCTCTGAAGGATTAC Rev : GTTCGGCTCCGATCAGTTC
STRTUCAR8_3534	<i>S. turgidiscabies</i>	Cellulase	For:GCCTCGACTACAACAAGAAGT Rev:TAGACGGAGCCCATCTTCA
STRTUCAR8_3570	<i>S. turgidiscabies</i>	Cellulase	For:GCCTGGAAGAAGATGTGGAA Rev:GTTTCATGGGCTCGAAGTAGAC
STRTUCAR8_9522	<i>S. turgidiscabies</i>	Cellulase	For:CTGGAGTTCCTGCTGAAGATG Rev:CTGTTCGTCGTGGATCTTGT

STRTUCAR8_9879	<i>S. turgidiscabies</i>	Cellulase	For:CTCAACAACCACACCAACAC Rev:ATGAAGAGCCAGTCGTTCTC
IQ63_25290	<i>S. acidiscabies</i>	Gyrase A ( <i>gyrA</i> )	For:AGCTGCTCTCGATGAATGTG Rev:TTCTCCTTCGAGGTGAAGTG
IQ63_12560	<i>S. acidiscabies</i>	Cellulase	For:GCCCCGCGACAACTACAA Rev:CAGTAGTCGCGGACCTG
IQ63_18720	<i>S. acidiscabies</i>	Cellulase	For:CTGGCCGATGTGGAAGAC Rev:GTTGGCGTGGATGCTGC
IQ63_19415	<i>S. acidiscabies</i>	Cellulase	For:TCCTGCCGACCCTCTAC Rev:CTGCTACGACACCCTGC
GYRA_STRCO	<i>S. coelicolor</i>	Gyrase A ( <i>gyrA</i> )	For:ACATCAAGCGCACCAAGA Rev:GGACACGAAGAAGTGGTTGA
SCO_1187	<i>S. coelicolor</i>	Cellulase B	For:TACAACGCCTCGTACGACATA Rev:CACCCTGTTGAACCAGATCAT
SCO_6545	<i>S. coelicolor</i>	Cellulase	For:GACAGCTACACCTGGAAGAAC Rev:TCTCGGTCCGGTTGAAGA
SCO_6546	<i>S. coelicolor</i>	Cellulase	For:CGTCCTACATCAACACCTTCC Rev:TTCTTGCCGCCGTACTTAA

---

SCO\_6548

*S. coelicolor*

Glucanase

For:TGGTCCAGCTGGTCATCTA

Rev:GTCGATGTACTCGGTCTTAG

---

## Enzymatic assay

Cellulase activity associated with culture supernatants of *Streptomyces* strains was carried out according to Lever (1972) as further described in Komeil et al. (2014). One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme releasing 1  $\mu\text{mol}$  of reducing sugar per min. The enzymatic activity was normalized to cellular DNA concentration to take into account variation in bacterial biomass. The procedure of Kieser et al. (2000) modified as specified by Padilla-Reynaud et al. (2015) was used to extract and quantify genomic DNA.

## Extracellular protein quantification and proteomics analysis

Protein concentration of *S. scabies* strain EF-35 supernatants was determined according to Bradford (1976) using bovine serum albumin as standard. Proteins in the supernatants were recovered and concentrated as previously described by Padilla-Reynaud et al. (2015). In gel protein digestion and mass spectrometry were performed at the Proteomics Platform of Eastern Quebec Genomics Center (Quebec City, QC, Canada) using a quadrupole time-of-flight mass spectrometer Qq-TOF (Sciex, Concord, ON, Canada) coupled to HPLC used with a nanospray source for the separation of peptides. Peptide identification was carried out as described by Padilla-Reynaud et al. (2015). Briefly, MS/MS spectra were compared to the *S. scabiei* strain 87.22 Uniref100 database and uploaded to the Scaffold software. The specified filter criteria were a 99% minimum protein ID probability with a minimum of two unique peptides in a protein for which the cut-off peptide threshold was set at 90%. Protein functions and cellular localization were predicted using various databases GeneBank, Pfam protein-domain/family, COG (Tatusov et al. 1997), CAZy (Lombard et al. 2014), PRIAM (Claudel-Renard et al. 2003), KEGG resources (Kanehisa et al. 2004), Phobius (Käll et al. 2007), SignalP 4.1 (Petersen et al. 2011), SecretomeP (Bendtsen et al. 2005a), TatP (Bendtsen et al. 2005b) and Tatfind 1.4 (Rose et al. 2002). The normalized spectral count (NSpC) of a protein

was obtained by dividing the spectral count number by its molecular weight and the normalized spectral abundance factor (NSAF) of a protein was calculated by dividing NSpC by the NSpC sum of all proteins in a sample (Neilson et al. 2011).

## Results

Expression of cellulase-encoding genes in pathogenic *Streptomyces* strains grown in the presence of cellobiose or suberin

The expression of ten cellulase-encoding genes of *S. scabiei* EF-35 was compared in a control medium supplemented or not with cellobiose or suberin. Gene expression was significantly higher in CM supplemented with suberin (CM+S) than in the control medium for all cellulase genes tested. Cellulase gene expression was also significantly lower in CM+Ce than in CM+S for all genes tested but SCAB\_5981. Gene expression of SCAB\_5981 did not significantly differ between both culture media. The other cellulase-encoding genes were 2 to 168-fold more expressed in the presence of suberin than in cellobiose (Table 3.2).

In contrast, the cellulase genes of both *S. turgidiscabies* Car8 and *S. acidiscabies* ATCC 49003 showed a higher level of expression when grown in cellobiose rather than in suberin (Table 3.2). For both species, all cellulase-encoding genes tested were between 2 to 8-fold overexpressed in the CM+Ce medium than in CM+S medium. When compared to the control medium, all *S. acidiscabies* cellulase-encoding genes tested were upregulated in CM+Ce. However, the level of expression between the control medium and the same medium supplemented with cellobiose significantly differed for only two out four *S. turgidiscabies* cellulase-encoding genes tested (Table 3.2). Suberin did not induce expression of both *S. turgidiscabies* Car8 and *S. acidiscabies* ATCC 49003 cellulase-encoding genes (Table 3.2). Three out of four *S. coelicolor* M145 cellulase genes showed an expression pattern similar to the ones associated with of *S. turgidiscabies* and *S. acidiscabies*, and were 6 to 10-fold overexpressed in the CM+Ce medium than in

CM+S. Only cellulase gene SCO\_1187 was overexpressed in the CM+S medium (Table 3.2).

**Table 3. 2. Relative expression level of targeted cellulase genes.**

Cellulase gene	Relative gene expression <sup>a</sup> (standard deviation)		
	CM+S <sup>b</sup>	CM+Ce <sup>b</sup>	
<i>S. scabies</i> gene			
SCAB_5981	24.18 (1.89) <sup>*e</sup>	19.89 (4.92) <sup>*</sup>	n.s <sup>c</sup>
SCAB_16431	10.27 (0.79) <sup>*</sup>	3.52 (0.09) <sup>*</sup>	s <sup>d</sup>
SCAB_17001	36.40 (4.15) <sup>*</sup>	2.47 (0.76)	s
SCAB_17011	131.05 (61.05) <sup>*</sup>	40.19 (14.15)	s
SCAB_17021	3.82 (0.35) <sup>*</sup>	0.47 (0.13) <sup>*</sup>	s
SCAB_36371	16.36 (0.80) <sup>*</sup>	1.61 (0.44)	s
SCAB_51081	56.65 (11.84) <sup>*</sup>	4.45 (0.60)	s
SCAB_90081	139.60 (24.26) <sup>*</sup>	0.83 (0.13)	s
SCAB_90091	70.46 (18.58) <sup>*</sup>	4.25 (1.90)	s
SCAB_90101	68.18 (5.57) <sup>*</sup>	1.60 (0.53)	s
<i>S. acidiscabies</i> gene			
IQ63_12560	0.27 (0.18)	2.22 (0.96) <sup>*</sup>	s
IQ63_18720	3.28 (1.72)	25.13 (10.38) <sup>*</sup>	s
IQ63_19415	0.44 (0.31)	3.12 (1.11) <sup>*</sup>	s
IQ63_34115	1.52 (0.35)	2.78 (0.74) <sup>*</sup>	s
<i>S. turgidiscabies</i> gene			
STRTUCAR8_3534	0.22 (0.06)	1.13 (0.56)	s
STRTUCAR8_3570	0.18 (0.03) <sup>*</sup>	0.81 (0.20)	s
STRTUCAR8_9522	0.95 (0.20)	4.50 (2.45) <sup>*</sup>	s
STRTUCAR8_9879	1.04 (0.49)	4.46 (2.13) <sup>*</sup>	s
<i>S. coelicolor</i> gene			
SCO_1187	1.65 (0.14) <sup>*</sup>	0.87 (0.27)	s
SCO_6545	0.73 (0.26)	4.43 (0.86) <sup>*</sup>	s
SCO_6546	1.95 (0.48)	7.57 (1.31) <sup>*</sup>	s
SCO_6548	0.42 (0.18) <sup>*</sup>	4.52 (0.43) <sup>*</sup>	s

Cellulase genes of *S. scabiei* EF-35, *S. acidiscabies* ATCC 49003, *S. turgidiscabies* Car8 and *S. coelicolor* M145 grown in a control medium supplemented with suberin (CM+S) or cellobiose (CM+Ce).

<sup>a</sup> Values are the mean of four replicates. Data were normalized with the *gyrA* gene used as internal control.



<sup>b</sup> Ratio between gene expression in a control medium containing casein as carbon source and the same medium supplemented with cellobiose (CM+Ce) or suberin (CM+S).

<sup>c</sup> n.s: Values within a row are not significantly different (P<0.05; LSD test)

<sup>d</sup> s: Values within a row are significantly different (P<0.05; LSD test)

<sup>e</sup> Values accompanied with an asterisk significantly differ from the control (P<0.05; LSD test).

#### Effects of cellobiose and suberin on cellulolytic activity in different *Streptomyces* strains

Cellulase activity associated with CM+Ce and CM+S culture supernatants was compared within different pathogenic and nonpathogenic *Streptomyces* strains. Both *S. scabiei* strains EF-35 and 87.22 showed higher cellulase activity in CM+S than in CM+Ce. The relative enzymatic activity was 4- to 10-fold lower in CM+Ce than in CM+S (Table 3.3). In contrast, cellulase activity was higher in the presence of cellobiose than suberin for *S. coelicolor* and *S. acidiscabies* strains (Table 3.3). Cellulase activity in *S. turgidiscabies* did not significantly vary within the culture media tested (Table 3.3). Addition of cellobiose in the CM+S medium significantly reduced cellulase activity in both *S. scabiei* strains (Figure 3.1).

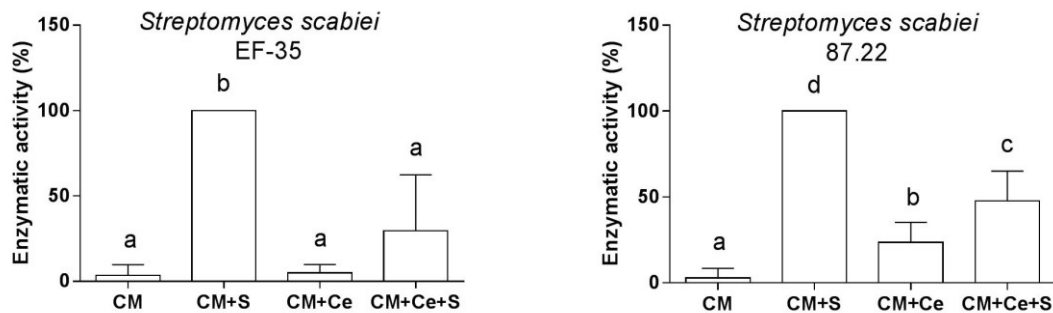
**Table 3. 3. Relative cellulase activity.**

Strain	Relative cellulase activity (%) <sup>a</sup>	
	CM+S	CM+Ce
<i>S. scabiei</i> EF-35	100.0 a <sup>b</sup>	9.3 b
<i>S. scabiei</i> 87.22	101.3 a	20.2 b
<i>S. acidiscabies</i> ATCC49003	3.3 a	216.4 b
<i>S. coelicolor</i> M145	0.3 a	27.3 b
<i>S. turgidiscabies</i> Car8	24.5 a	9.0 a

Relative cellulase activity between pathogenic and nonpathogenic *Streptomyces* strains grown in the presence of suberin (CM+S) or cellobiose (CM+Ce).

<sup>a</sup> Cellulase activity is relative to the cellulase activity of *S. scabiei* strain of EF-35 in CM+S medium .

<sup>b</sup> Data are the mean of three replicates. Values within a row accompanied by the same letter are not significantly different (P<0.05, LSD test)



**Figure 3. 1. Relative enzymatic activity of *Streptomyces scabiei* strains EF-35 and 87.22.**

Grown in control medium (CM) supplemented or not with suberin (CM+S), cellobiose (CM+Ce) or both cellobiose and suberin (CM+Ce+S). The activity was compared to the one associated with *S. scabiei* EF-35 in CM+S. Data shown are the mean of three replicates. Data with the same letter are not significantly different ( $P < 0.05$ , LSD test).

#### Characterization of *S. scabiei* secretome in cellobiose-containing media

A total of 277 proteins produced by *S. scabiei* EF-35 in CM+Ce passed the filter criteria. The supplementary Table S3 presents the list of these proteins. About half of them (138 proteins) were predicted to have an extracellular localization. These proteins were divided into 17 functional groups and their NSAF was determined. The CM+Ce secretome is characterized by a predominance of proteins belonging to the functional group Carbohydrate transport and metabolism that comprised 25 proteins with a NSAF of 21.0 (Table 3.4). Among this group, 17 proteins were putative glycosyl hydrolases (NSAF = 9.8) and eight were predicted to be cellulases (NSAF = 2.7) (Table 3.5).

The addition of suberin to CM+Ce only slightly increased protein diversity. A total of 288 proteins (Suppl. Table 3) were associated with this last medium (CM+Ce+S) and among them 145 proteins were predicted to have an extracellular localization. Among the predicted extracellular proteins, the most abundant functional group was also the Carbohydrate transport and metabolism group, with a NSAF of 31.0 representing 39 proteins (Table 3.4). This group included 29 putative glycosyl hydrolases (NSAF = 14.4) including 11 putative cellulases (NSAF = 5.5) (Table 3.4). The putative xylanase C9YW88 was the most abundant glycosyl hydrolase in both CM+Ce and CM+Ce+S with a NSAF of 5.25 and 2.16, respectively (Table 3.5). Only two other glycosyl hydrolases were proportionally more abundant in CM+Ce than CM+Ce+S, the putative chitinase C9Z115 and the putative chitobiase C9Z885 (Table 3.5). Proteins involved in sugar transport appeared to be down regulated by addition of suberin in CM+Ce medium (C9YVX8, C9YUG2, C9ZAD0, C9Z804 and C9Z451) or were found in similar proportions in both media (C9ZDW4) (Table 3.5).

**Table 3. 4. Distribution within functional groups of *Streptomyces scabiei* strain EF-35.**

Functional group	CM+Ce		CM+Ce+S	
	NSAF (%)	Number of proteins	NSAF (%)	Number of proteins
Amino acid transport and metabolism	12.7	15.0	16.0	17.0
Carbohydrate transport and metabolism	21.0	25.0	31.0	39.0
Cell envelope biogenesis, outer membrane	2.0	4.0	0.5	3.0
Defense mechanisms and virulence	0.4	3.0	0.0	2.0
Energy production and conversion	0.8	2.0	1.1	3.0
Function unknown	33.0	47.0	19.0	38.0
General function prediction only	15.0	22.0	15.0	21.0
Inorganic ion transport and metabolism	4.5	2.0	9.3	3.0
Lipid transport and metabolism	1.7	4.0	3.8	6.0
Nucleotide transport and metabolism	1.8	4.0	1.5	4.0
Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	0.8	3.0	0.4	2.0
Signal transduction mechanism	0.4	1.0	0.9	2.0

Cell division and chromosome partitioning	0.1	1.0	0.0	1.0
Coenzyme metabolism	0.0	0.0	0.0	0.0
Translation ribosomal structure and biogenesis	5.2	3.0	0.7	2.0
Transcription	1.0	1.0	0.7	1.0
Morphology	0.0	1.0	0.1	1.0

---

Predicted extracellular proteins associated with control medium supplemented with cellobiose (CM+Ce) or both cellobiose and suberin (CM+Ce+S).

**Table 3. 5. Predicted extracellular proteins of *Streptomyces scabiei* strain EF-35.**

Uniprot accession number	Corresponding gene in <i>S.</i> <i>scabiei</i> 87.22 genome	Putative protein function	CAZy classification	Normalized Abundance Spectral Factor (%)	
				CM+Ce	CM+Ce+S
<b><u>Cellulases</u></b>					
C9Z0D5	<b><i>cel1<sup>a</sup></i></b>	Cellulase	CBM4; GH9	0.15	0.23
C9ZD50	<b>SCAB_16431</b>	Cellulase	GH6	0.07	1.03
C9ZEP9	<b>SCAB_17001</b>	Cellulase	CBM2; GH6	0.08	0.31
C9ZEQ0	<b>SCAB_17011</b>	Cellulase	CBM2; GH48	0.33	0.28
C9ZEQ1	<b>SCAB_17021</b>	Cellulase	CBM2; GH74	ND <sup>b</sup>	0.34
C9YTK2	<b>SCAB_51081</b>	Cellulase	CBM2; GH5	0.76	0.84
C9Z9L5	<b>SCAB_90081</b>	Cellulase B	CBM2; GH12	0.19	0.47
C9Z9L6	<b>SCAB_90091</b>	Cellulase	CBM2; GH48	0.43	0.49
C9Z9L7	<b>SCAB_90101</b>	Cellulase	CBM2; GH6	0.65	1.51

**Other glycosyl hydrolases**

C9ZGN8	<i>chiA</i>	Chitinase A	CBM16; GH18	0.12	0.86
C9Z8E5	<i>chiC</i>	Chitinase C	CBM2; GH18	0.23	0.21
C9YVP9	SCAB_6021	$\beta$ -xylanase	GH10	ND	0.75
C9Z507	SCAB_11431	Glycosyl hydrolase	GH43	0.01	0.07
C9Z885	SCAB_13561	Chitobiase	NF <sup>c</sup>	0.31	0.04
C9ZBL8	SCAB_15711	Glucosidase	CBM6; GH16	ND	0.14
C9ZD59	SCAB_16521	$\alpha$ -L-arabinofuranosidase	CBM42; GH43	ND	0.17
C9YSZ3	SCAB_18831	Levansucrase	GH68	ND	0.31
C9YUZ2	SCAB_36371	$\beta$ -xylanase	CBM2; GH10	ND	0.61
C9YW88	SCAB_37051	Xylanase	GH10	5.25	2.16
		Galactan endo-1,6- $\beta$ -			
C9Z737	SCAB_43661	galactosidase	CBM13; GH30 CBM13;	0.03	0.07
C9Z7A0	SCAB_44311	$\alpha$ -galactosidase	CBM35; GH27	ND	0.24
C9ZFW3	SCAB_66031	Arabinofuranosidase	CBM42; GH43	0.05	0.19
C9Z4J7	SCAB_74141	$\alpha$ -N-furanosidase	GH51	ND	0.06
C9Z623	SCAB_74681	Licheninase	NF	ND	0.18
C9Z7Q2	SCAB_75761	Chitinase	GH18	D <sup>d</sup>	0.27



C9ZE95	SCAB_79251	Xylanase A	CBM13; GH10	0.05	1.51
C9YU11	SCAB_81841	Glycosyl hydrolase	GH78	ND	0.06
C9Z1I5	SCAB_85231	Chitinase	CBM12; GH19	1.13	0.78
C9Z2V1	<i>xlnB</i>	Endo-1,4- $\beta$ -xylanase	GH11	ND	0.20

#### **Non glycosyl hydrolases**

A0A086H2Q6	IQ62_5115	Sugar dehydrogenase	NF	1.3	4.16
		ABC-type sugar			
C9YUG2	SCAB_5351	transport system protein	NF	2.21	0.67
C9Z1T6	SCAB_9291	Lactonase	NF	D	0.57
		Xylose ABC transporter			
C9YVX8	SCAB_21021	substrate-binding protein	NF	2.99	1.23
		Extracellular sugar-			
C9ZAD0	SCAB_30191	binding protein	NF	0.32	ND
		Glucose / Sorbosone			
C9Z5L1	SCAB_42951	dehydrogenase	NF	2.66	8.82
C9Z451	<b>SCAB_57751</b>	Cellobiose-binding, CebE	NF	0.61	0.07
		ABC-type xylose			
C9ZDW4	SCAB_63891	transport system	NF	0.18	0.13

C9YYE6	SCAB_70551	Pectate lyase	NF	ND	0.96
C9YU67	SCAB_82421	Pectate lyase	NF	ND	0.09
C9Z804	<b>SCAB_89741</b>	Cellulose-binding protein	AA10	0.66	0.15

---

Predicted extracellular proteins associated with the Carbohydrate transport and metabolism functional group and produced in a medium supplemented with cellobiose (CM+Ce) or both cellobiose and suberin (CM+Ce+S).

<sup>a</sup> Genes in bold characters have a CebR-binding site upstream the coding sequence

<sup>b</sup> ND: Non detected

<sup>c</sup> NF :No module has been found in the protein

<sup>d</sup> D : Detected. Peptides have not met the filtering criteria as described in the Material and Methods section

## Discussion

In a previous study, it has been shown that *S. scabiei* exhibited a weak cellulase activity when grown in the presence of cellulose (Padilla-Reynaud et al. 2015). This weak activity is striking considering that the CAZy gene content of *S. scabiei* clusters closely with *Streptomyces* strains exhibiting high rates of cellulose degrading activity (Book et al. 2016). As *S. scabiei* cellulolytic activity increases when the bacterium is grown in the presence of both suberin and cellulose (Padilla-Reynaud et al. 2015), one can hypothesize that the presence in a culture medium of cellobiose, the main degradation product of cellulose, is not sufficient to induce an efficient biosynthesis of cellulases in *S. scabiei*. Here, it was shown that the cellulolytic activity exhibited by two *S. scabiei* strains was lower in a medium containing cellobiose than suberin. Moreover, all *S. scabiei* strain EF-35 cellulase-encoding genes were overexpressed in the presence of suberin while only three of these genes were more expressed in the CM+Ce medium than in the control medium. These data thus support the previous assumption. Although cellobiose is known to trigger the expression of cellulolytic enzymes genes in most actinobacteria (Lin and Wilson, 1987; Pérez-Pons et al. 1995; Hodgson, 2000), cellobiose is not seen as a good inducer of endoglucanases in some *Streptomyces* strains (Godden et al. 1989). The weak cellulolytic activity in CM+Ce is, however, not due to the inability of *S. scabiei* to assimilate cellobiose as cellobiose uptake has previously been demonstrated in *S. scabiei* strain EF-35 (Lerat et al. 2010). Furthermore, CebE (C9Z451), a cellobiose-binding protein that was associated with cellobiose transport in *S. scabiei* 87.22 (Jourdan et al. 2016), was found in both CM+Ce and CM+Ce+S supernatants. The stimulating effect of suberin on both cellulase gene expression and cellulase activity was, however, restricted to *S. scabiei* strains as it was neither observed in other common-scab inducing species nor in *S. coelicolor*. With exception for SCO1187, all *S. acidiscabies*, *S. turgidiscabies* and *S. coelicolor* cellulase-encoding genes tested were significantly more expressed in the presence of cellobiose than suberin. For these species, cellulase activity was the highest in CM+Ce medium (*S.*

*acidiscabies* and *S. coelicolor*) or did not vary depending on the growth medium (*S. turgidiscabies*).

Padilla-Reynaud et al. (2015) previously demonstrated that *S. scabiei* exhibited a higher cellulolytic activity in the presence of both suberin and cellulose than in the presence of each polymer alone. Addition of suberin in the cellobiose-containing medium did cause a slight increase of the cellulolytic activity that was shown to be significant in strain 87.22 but cellulase activity was higher in the medium containing only suberin than both suberin and cellobiose. The proteomics study revealed that *S. scabiei* strain EF-35 cellulase proteins accounted for 2.7 and 5.5% (NSAF) of total secreted proteins in CM+Ce and CM+Ce+S, respectively. Although addition of suberin in the cellobiose-containing medium increased the NSAF associated with the cellulolytic enzymes, cellulases were previously reported to be found in higher proportions in the same control medium supplemented with suberin only (NSAF of 8.4; Komeil et al. 2013) or with both suberin and cellulose (NSAF of 11.6; Padilla-Reynaud et al. 2015) suggesting that high concentration of cellobiose could partially counteract the positive effect of suberin on cellulase biosynthesis.

CebR has been identified as the repressor of cellulose catabolism in *Streptomyces* species (Schlösser et al. 1999). About 20 CebR-binding sites are present in *S. scabiei* genome (Book et al. 2016). Such CebR-binding sites (TGGGAGCGCTCCCA) (Book et al. 2016) were found upstream of all genes coding for the cellulases identified in this proteomics study. Cellobiose thus likely regulates cellulase gene expression in *S. scabiei*. The fact that a higher cellulase gene expression was recorded in the presence of suberin than in the presence of cellobiose suggests that the inducing ability of suberin could not be only attributed to the presence of residual cell wall polysaccharides in the purified potato suberin. Furthermore, the fact that *S. scabiei* strain EF-35 was shown to exhibit a higher cellulase activity when grown in the presence of both suberin and cellulose than in the presence of only one of each polymer (Padilla-Reynaud et al. 2015) suggests

that cellulase biosynthesis could be hampered by a high amount of cellobiose but not by a gradual release of the disaccharide from cellulose or suberized cell walls. Biosynthesis of CebE (C9Z451), the cellobiose-binding protein associated with cellobiose transport, was shown to be under the control CebR in *S. scabiei* (Jourdan et al. 2016) but while CebE was highly produced in media supplemented with cellobiose (this study), with cellulose (Padilla-Reynaud et al. 2015) or with both cellulose and suberin (Padilla-Reynaud et al. 2015), the NSAF of CebE was about 8-fold reduced when suberin was added to the cellobiose-containing medium (this study) suggesting that cellobiose and suberin exert some antagonistic effect on the regulation of cellulase production. While suberin was shown to stimulate morphological differentiation in *Streptomyces* species, *S. scabiei* did not form aerial mycelium in some culture media supplemented with cellobiose (Lerat et al. 2010; Lerat et al. 2011). It is then possible that cellulase biosynthesis is in some way connected to the complex regulation network of *S. scabiei* morphological development as it has been suggested for *S. coelicolor* (Hengst et al. 2010). Interestingly, a CebR binding site (only two mismatched bases) is found in the coding sequence of *bldH*. This gene is not only involved in morphological differentiation, as a *S. scabiei bldH* deletion mutant produced a lower amount of thaxtomin A and displayed reduced virulence (Bignell et al. 2014).

The role of the cellulolytic enzymes in *S. scabiei* pathogenicity has not been explored yet. These enzymes might, however, be necessary to provide cellobiose, an inducer of the thaxtomin biosynthetic genes encoding toxins essential for pathogenicity (Johnson et al. 2007). In contrast to some other common scab-inducing species such as *S. turgidiscabies* and *S. acidiscabies* for which suberin did not play a role in cellulase production, the polymer appears to be a key factor in *S. scabiei* pathogenicity being involved in both cellulase (Padilla-Reynaud et al. 2015) and thaxtomin production (Lerat et al. 2010). Common scab-inducing species gain entry into potato tubers through lenticels (Huang, 1986). At the early stages of tuber formation, the lenticels exhibit no suberization (Tyner et al. 1997). During this period,

common scab-inducing pathogens could possibly retrieve carbon from the cellulosic cell walls. *S. scabiei* appears, however, especially well adapted to its host as it shows the ability to degrade cellulosic material embedded in suberized cell walls of potato periderm (Beaulieu et al. 2016). This ability could not only contribute to *S. scabiei* virulence but also to the pathogen fitness. By degrading the suberized cell walls of potato periderm, *S. scabiei* could take advantage of a tissue recalcitrant to microbial degradation (Sidibé et al. 2016) and ensure its survival on potato debris in soil.

#### Acknowledgements

This work was supported by the National Science Engineering Research Council of Canada (NSERC Discovery Grant number 018602).

## References

1. Amore, A., Pepe, O., Ventorino, V., Birolo, L., Giangrande, C., and Faraco, V. 2012. Cloning and recombinant expression of a cellulase from cellulolytic strain *Streptomyces* sp. G12 isolated from compost. *Microb. Cell Fact.* 11: 164. doi:10.1186/1475-2859-11-164.
2. Babcock, M.J., Eckwall, E.C., and Schottel, J.L. 1993. Production and regulation of potato-scab inducing phytotoxins by *Streptomyces scabies*. *J. Gen. Microbiol.* 139: 1579–1586. doi:10.1099/00221287-139-7-1579.
3. Beaulieu, C., Sidibé, A., Jabloun, R., Simao-Beaunoir, A.-M., Lerat, S., Monga, E., and Bernards, M.. Physical, chemical and proteomic evidence of potato suberin degradation by the plant pathogenic bacterium *Streptomyces scabiei*. *Microbes Environ.* 31: 427-434. PMID :27853060
4. Beauséjour, J., Goyer, C., Vachon, J., and Beaulieu, C. 1999. Production of thaxtomin A by *Streptomyces scabies* strains in plant extract containing media. *Can. J. Microbiol.* 45: 764–768. doi:10.1139/w99-072.
5. Bendtsen, J.D., Kierner, L., Fausbøll, A., and Brunak, S. 2005a. Nonclassical protein secretion in bacteria. *BMC Microbiol.* 5: 58. doi:10.1186/1471-2180-5-58. PMID: 16212653.
6. Bendtsen, J.D., Nielsen, H., Widdick, D., Palmer, T., and Brunak, S. 2005b. Prediction of twin-arginine signal peptides. *BMC Bioinformatics*, 6: 167. doi:10.1186/1471-2105-6-167. PMID:15992409.
7. Bibb, M.J., Freeman, R.F., and Hopwood, D.A. 1977. Physical and genetical characterisation of a second sex factor, SCP2, for *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Gen. Genet.* 154: 155–166. doi:10.1007/BF00330831.
8. Bignell, D.R.D., Huguet-Tapia, J.C., Joshi, M.V., Pettis, G.S., and Loria, R. 2010. What does it take to be a plant pathogen: genomic insights from *Streptomyces* species. *Antonie Leeuwenhoek*, 98: 179–194. doi:10.1007/s10482-010-9429-1. PMID:20396949.
9. Bignell, D.R.D., Francis, I.M., Fryans, J.K., and Loria, R. 2014. Thaxtomin A production and virulence are controlled by several *bld* gene global regulators in *Streptomyces scabies*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 27: 875–885. doi:10.1094/MPMI-02-14-0037-R. PMID: 24678834.
10. Book, A.J., Lewin, G.R., McDonald, B.R., Takasuka, T.E., Wendt- Pienkowski, E., Doering, D.T., Suh, S., Raffa, K.F., Fox, B.G., and Currie, C.R. 2016.

Evolution of high cellulolytic activity in symbiotic *Streptomyces* through selection of expanded gene content and coordinated gene expression. PLoS Biol. 14: e1002475. doi:10.1371/journal.pbio.1002475.

11. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. 72: 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3. PMID:942051.
12. Bukhalid, R.A., Chung, S.Y., and Loria, R. 1998. *nec1*, a gene conferring a necrogenic phenotype, is conserved in plant-pathogenic *Streptomyces* spp. and linked to a transposase pseudogene. Mol. Plant-Microbe Interact. 11: 960–967. doi:10.1094/MPMI.1998.11.10.960.
13. Claudel-Renard, C., Chevalet, C., Faraut, T., and Kahn, D. 2003. Enzyme-specific profiles for genome annotation: PRIAM. Nucleic Acids Res. 31: 6633–6639. doi:10.1093/nar/gkg847. PMID:14602924.
14. Faucher, E., Savard, T., and Beaulieu, C. 1992. Characterization of actinomycetes isolated from common scab lesions on potato tubers. Can. J. Plant Pathol. 14: 197–202. doi:10.1080/0706069209500874.
15. Flärdh, K., and Buttner, M.J. 2009. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. Nat. Rev. Microbiol. 7: 36–49. doi:10.1038/nrmicro1968. PMID:19079351.
16. Francis, I.M., Jourdan, S., Fanara, S., Loria, R., and Rigal, S. 2015. The cellobiose sensor CebR is the gatekeeper of *Streptomyces scabiei* pathogenicity. MBio. 6: e02018–14. doi:10.1128/mBio.02018-14.
17. Fry, B.A., and Loria, R. 2002. Thaxtomin A: evidence for plant cell wall target. Physiol. Mol. Plant Path. 60:1-8. doi:10.1006/pmpp.2001.0371.
18. Godden, B., Legon, T., Helvestein, P., and Pennickx, M. 1989. Regulation of the production of hemicellulolytic and cellulolytic enzymes by a *Streptomyces* sp. growing on lignocellulose. J. Gen. Microbiol. 135: 285–292. PMID:2515244.
19. Hengst, C.D.d., Tran, N.T., Bibb, M.J., Chandra, G., Leskiw, B.K., and Buttner, M.J. 2010. Genes essential for morphological development and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* are targets of BldD during vegetative growth. Mol. Microbiol. 78: 361–379. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07338.x. PMID:20979333.



20. Hodgson, D.A. 2000. Primary metabolism and its control in *Streptomyces*: A most unusual group of bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* 42:47-238. PMID:10907551.
21. Huang, J.-S. 1986. Ultrastructure of bacterial penetration in plants. *Ann. Rev. Phytopathol.* 24: 141–57. doi:10.1146/annurev.py.24.090186.001041.
22. Johnson, E.G., Joshi, M.V., Gibson, D.M., and Loria, R. 2007. Cello-oligosaccharides released from host plants induce pathogenicity in scab-causing *Streptomyces* species. *Physiol. Mol. Plant Path.* 71: 8–25. doi:10.1016/j.pmpp.2007.09.003.
23. Joshi, M.V., Bignell, D.R.D., Johnson, E.G., Sparks, J.P., Gibson, D.M., and Loria, R. 2007. The AraC/XylS regulator TxtR modulates thaxtomin biosynthesis and virulence in *Streptomyces scabies*. *Mol. Microbiol.* 66: 633–642. PMID:17919290.
24. Jourdan, S., Francis, I.M., Kim, M.J., Salazar, J.J.C., Planckaert, S., Frère, J.-M., Kerff, F., Devreese, B., Loria, R., and Rigali, S. 2016. The CebE/MsiK transporter is a doorway to the cello-oligosaccharide-mediated induction of *Streptomyces scabies* pathogenicity. *Sci. Rep.* 6: 27144. doi:10.1038/srep27144.
25. Juturu, V., and Wu, J.C. 2014. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 33: 188–203. doi:10.1016/j.rser.2014.01.077.
26. Käll, L., Krogh, A., and Sonnhammer, E.L.L. 2007. Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction-the Phobius web server. *Nucleic Acids Res.* 35: 429–432. doi:10.1093/nar/gkm256. PMID:17483518.
27. Kanehisa, M., Goto, S., Kawashima, S., Okuno, Y., and Hattori, M. 2004. The KEGG resource for deciphering the genome. *Nucleic Acids Res.* 32: D277–D280. PMID:14681412.
28. Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F., and Hopwood, D.A. 2000. *Practical Streptomyces genetics*. John Innes Foundation, Norwich, UK.
29. King, R.R., Lawrence, C.H., and Clark, M.C. 1991. Correlation of phytotoxin production with pathogenicity of *Streptomyces scabies* isolates from scab infected potato tubers. *Am. Potato J.* 68:675-680.
30. Komeil, D., Simao-Beaunoir, A.-M., and Beaulieu, C. 2013. Detection of potential suberinase-encoding genes in *Streptomyces scabiei* strains and other

- actinobacteria. Can. J. Microbiol. 59: 294–303. doi:10.1139/cjm-2012-0741. PMID:23647341.
31. Komeil, D., Padilla-Reynaud, R., Lerat, S., Simao-Beaunoir, A.-M., and Beaulieu, C. 2014. Comparative secretome analysis of *Streptomyces scabiei* during growth in the presence or absence of potato suberin. Proteome Sci. 12:35. doi:10.1186/1477-5956-12-35.
  32. Lambert, D.H., and Loria, R. 1989. *Streptomyces scabies* sp. nov., nom. rev. Int. J. Syst. Bacteriol. 39: 387–392. doi:10.1099/00207713-39-4-387.
  33. Legault, G.S., Lerat, S., Nicolas, P., and Beaulieu, C. 2011. Tryptophan regulates thaxtomin A and indole-3-acetic acid production in *Streptomyces scabiei* and modifies its interactions with radish seedlings. Phytopathology. 101: 1045–1051. doi:10.1094/PHYTO-03-11-0064.
  34. Lerat, S., Simao-Beaunoir, A.-M., Wu, R., Beaudoin, N., and Beaulieu, C. 2010. Involvement of the plant polymer suberin and the disaccharide cellobiose in the triggering thaxtomin A biosynthesis, a phytotoxin produced by the pathogenic agent *Streptomyces scabies*. Phytopathology, 100: 91–96. doi:10.1094/PHYTO-100-1-0091.
  35. Lerat, S., Forest, M., Lauzier, A., Grondin, G., Lacelle, S., and Beaulieu, C. 2011. Potato suberin induces differentiation and secondary metabolism in the genus *Streptomyces*. Microbes Environ. 27: 36–42. doi:10.1264/jsme2.ME11282. PMID:22129602.
  36. Lever, M. 1972. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. Anal. Biochem. 47: 273–279. doi:10.1016/0003-2697(72)90301-6. PMID:5031119.
  37. Lin, E., and Wilson, D.B. 1987. Regulation of  $\beta$ -1,4-endoglucanase synthesis in *Thermospora fusca*. Appl. Environ. Microbiol. 53: 1352–1357.
  38. Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P.M., and Henrissat, B. 2014. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. Nucleic Acids Res. 42: D490–D495. doi:10.1093/nar/gkt1178. PMID:24270786.
  39. Loria, R., Bukhalid, R.A., Fry, B.A., and King, R.R. 1997. Plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. Plant Dis. 81: 836–846.
  40. Loria, R., Kers, J., and Joshi, M. 2006. Evolution of plant pathogenicity in *Streptomyces*. Annu. Rev. Phytopathol. 44: 469–487. doi:10.1146/annurev.phyto.44.032905.091147. PMID:16719719.

41. Marushima, K., Ohnishi, Y., and Horinouchi, S. 2009. CebR as a master regulator for cellulose/cellooligosaccharide catabolism affects morphological development in *Streptomyces griseus*. J. Bacteriol. 191: 5930–5940. doi:10.1128/JB.00703-09. PMID:19648249.
42. Miyajima, K., Tanaka, F., Takeuchi, T., and Kuninaga, S. 1998. *Streptomyces turgidiscabies* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 48: 495–502. doi:10.1099/00207713-48-2-495. PMID:9731290.
43. Neilson, K.A., Ali, N.A., Muralidharan, S., Mirzaei, M., Mariani, M., Assadourian, G., Lee, A., Van Sluyter, S.C., and Haynes, P.A. 2011. Less label, more free: approaches in label-free quantitative mass spectrometry. Proteomics. 11: 535–553. doi:10.1002/pmic.201000553. PMID:21243637.
44. Padilla-Reynaud, R., Simao-Beaunoir, A.-M., Lerat, S., Bernards, M.A., and Beaulieu, C. 2015. Suberin regulates the production of cellulolytic enzymes in *Streptomyces scabiei*, the causal agent of potato common scab. Microbes Environ. 30: 245–253. doi:10.1264/jsme2.ME15034.
45. Pérez-Pons, J.A., Rebordosa, X. and Querol, E. 1995. Induction and preliminary characterization of intracellular  $\beta$ -glucosidases from a cellulolytic *Streptomyces* strain. FEMS Microbiol lett. 128: 235–239. PMID:7781969.
46. Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., and Nielsen, H. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. Nat. Methods. 8: 785–786. doi:10.1038/nmeth.1701. PMID:21959131.
47. Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 29: 2002–2007. doi:10.1093/nar/29.9.e45. PMID:11328886.
48. Pinheiro, G.L., de Azevedo-Martins, A.C., Albano, R.M., de Souza, W., and Frases, S. 2016. Comprehensive analysis of the cellulolytic system reveals its potential for deconstruction of lignocellulosic biomass in a novel *Streptomyces* sp. Appl. Microbiol. Biot. 1-19. doi:10.1007/s00253-016-7851-7.
49. Rose, R.W., Brüser, T., Kissinger, J.C., and Pohlschröder, M. 2002. Adaptation of protein secretion to extremely high salt concentrations by extensive use of the twin arginine translocation pathway. Mol. Microbiol. 45: 943–950. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.03090.x. PMID:12180915.
50. Schlösser, A., Jantos, J., Hackmann, K., and Schrempf, H. 1999. Characterization of the binding protein-dependent cellobiose and cellotriose transport system of the cellulose degrader *Streptomyces reticuli*. Appl. Environ. Microbiol. 65: 2636–2643. PMID:10347054.

51. Sidibé, A., Simao-Beaunoir, A.-M., Lerat, S., Giroux, L., Toussaint, V., and Beaulieu, C. Proteome analyses of soil bacteria grown in the presence of potato suberin, a recalcitrant biopolymer. *Microbes Environ.* 31: 418-426. PMID:27795492
52. Tatusov, R.L., Koonin, E.V., and Lipman, D.J. 1997. A genomic perspective on protein families. *Science*. 278: 631–637. doi:10.1126/science.278.5338.631. PMID:9381173.
53. Tyner, D.N., Hocart, M.J., Lennard, J.H., and Graham, D.C. 1997. Periderm and lenticels characterization in relation to potato cultivar, soil moisture and tuber maturity. *Potato Res.* 40: 181–190.

**Table S3. Proteins produced by *Streptomyces scabiei* EF-35.**

Uniprot accession number	Corresponding gene in <i>S.</i> <i>scabiei</i> genome	Putative function	NSpC <sup>a</sup>	
			CM+Ce	CM+Ce+S
Amino acid transport and metabolism				
C9YWB0	<i>aspC</i>	Aspartate aminotransferase	0.32	0.11
C9Z1W0	<i>cpeB</i>	Catalase-peroxidase	0.25	0.21
C9ZHG5	<i>glnA</i>	Glutamine synthetase	0.06	0.13
C9Z0P2	<i>gluA</i>	Glutamate uptake system ATP-binding subunit	ND <sup>b</sup>	0.07
C9Z7P2	<i>hisG</i>	ATP phosphoribosyltransferase	0.13	ND
C9YZE4	<i>hutU</i>	Urocanate hydratase	0.07	ND
C9YW55	<i>infA</i>	Translation initiation factor IF-1	0.25	0.25
<b>A0A086GWT9<sup>c</sup></b>	IQ62_17050	Peptide ABC transporter substrate-binding protein	ND	0.20

A0A086GM76	IQ62_35445	Aminopeptidase N	0.07	0.02
C9Z8S2	<i>metG</i>	Methionine-tRNA ligase	0.12	0.03
C9YTR8	<i>pepA</i>	Cytosol aminopeptidase	0.04	0.04
C9Z7B6	<i>pepN</i>	Aminopeptidase N	0.15	0.06
C9YZJ1	<i>sahH</i>	Adenosylhomocysteinase	0.21	ND
<b>C9Z862</b>	SCAB_13321	X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase	0.04	0.06
<b>C9ZGG7</b>	SCAB_18081	$\gamma$ -glutamyltranspeptidase	0.33	0.75
<b>C9ZGM2</b>	SCAB_18661	Serine protéase	0.12	1.88
<b>C9Z204</b>	SCAB_24891	Glutamate uptake system binding subunit	0.66	1.21
<b>C9Z5D4</b>	SCAB_27411	Oligopeptide-binding transport system protein	0.22	0.03
C9ZBZ2	SCAB_31501	Peptide ABC transporter	ND	0.07
<b>C9YXR8</b>	SCAB_37611	Aminopeptidase	1.21	1.26
C9YZ58	SCAB_38401	3-octaprenyl-4-hydroxybenzoate carboxy-lyase	0.06	D <sup>d</sup>
<b>C9Z7C3</b>	SCAB_59681	Peptidase	0.10	0.08
C9Z7C5	SCAB_59701	Aminopeptidase	0.07	ND
<b>C9YWP0</b>	SCAB_68931	ABC transporter substrate-binding protein	0.98	1.23
<b>C9YZP9</b>	SCAB_70761	Solute-binding protein	0.57	0.30
C9Z1B0	SCAB_71831	Alanine dehydrogenase	0.08	ND

<b>C9YU17</b>	SCAB_81901	Solute-binding protein	0.29	0.12
C9YU85	SCAB_82611	Aldolase	0.05	ND
<b>C9Z058</b>	SCAB_84971	Amidase	0.22	0.39
<b>C9Z4N7</b>	SCAB_87271	Peptidase	0.16	0.34
<b>C9Z800</b>	SCAB_89701	Subtilisin-like protease	ND	0.10
C9Z599	<i>serA</i>	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	0.09	0.04
C9YTK4	<i>serC</i>	Phosphoserine aminotransferase	0.10	0.05
<b>C9YVT3</b>	<i>snp3</i>	Extracellular small neutral protéase	0.11	0.37
<b>C9Z1E7</b>	<i>sprB</i>	Serine protéase	0.15	0.85
<b>C9ZAN4</b>	<i>ssb2</i>	Single-stranded DNA-binding protein	0.11	0.32

#### Carbohydrate transport and metabolism

C9Z8C3	<i>abpS</i>	Cellulose-binding protein	ND	0.26
<b>C9Z0D5</b>	<i>cel1</i>	Cellulase	0.06	0.14
<b>C9ZGN8</b>	<i>chiA</i>	Chinitase A	0.05	0.52
<b>C9Z8E5</b>	<i>chiC</i>	Chitinase C	0.09	0.13
C9YY37	<i>eno</i>	Enolase	0.24	ND

C9Z433	<i>fba</i>	Fructose 1.6-bisphosphate aldolase 2.3-bisphosphoglycerate-dependent	0.11	0.08
C9ZH18	<i>gpmA</i>	phosphoglycerate mutase	0.29	ND
<b>A0A086H2Q6</b>	IQ62_05115	Sugar dehydrogenase	0.54	2.49
C9YY67	<i>pgi2</i>	Glucose-6-phosphate isomerase	0.05	0.02
C9YY63	<i>pgk</i>	Phosphoglycerate kinase	0.12	0.05
<b>C9YUG2</b>	SCAB_5351	ABC-type sugar transport system protein	0.91	0.40
<b>C9YVP9</b>	SCAB_6021	$\beta$ -xylanase	ND	0.45
<b>C9Z1T6</b>	SCAB_9291	Lactonase	D	0.34
<b>C9Z507</b>	SCAB_11431	Glycosyl hydrolase	0.01	0.04
<b>C9Z885</b>	SCAB_13561	Glycosyl hydrolase	0.13	0.03
<b>C9ZBL8</b>	SCAB_15711	Glucosidase	ND	0.09
<b>C9ZD50</b>	SCAB_16431	Cellulase	0.03	0.62
<b>C9ZD59</b>	SCAB_16521	$\alpha$ -L-arabinofuranosidase	ND	0.10
<b>C9ZEP9</b>	SCAB_17001	Cellulase	0.03	0.18
<b>C9ZEQ0</b>	SCAB_17011	Cellulase	0.14	0.17
<b>C9ZEQ1</b>	SCAB_17021	Cellulase	ND	0.20
<b>C9YSZ3</b>	SCAB_18831	Levansucrase	ND	0.19



<b>C9YVX8</b>	SCAB_21021	Xylose ABC transporter substrate-binding protein	1.24	0.74
C9Z6T4	SCAB_27731	Glycosyl hydrolase	ND	0.13
<b>C9ZAD0</b>	SCAB_30191	Extracellular sugar-binding protein	0.13	ND
<b>C9YUZ2</b>	SCAB_36371	$\beta$ -xylanase	ND	0.37
<b>C9YW88</b>	SCAB_37051	Xylanase	2.17	1.29
<b>C9Z5L1</b>	SCAB_42951	Glucose / Sorbosone dehydrogenase	1.10	5.28
<b>C9Z737</b>	SCAB_43661	Galactan endo-1.6- $\beta$ -galactosidase	0.01	0.04
<b>C9Z7A0</b>	SCAB_44311	$\alpha$ -galactosidase	ND	0.14
<b>C9YTK2</b>	SCAB_51081	Cellulase	0.31	0.50
C9Z448	SCAB_57721	$\beta$ -glucosidase	0.08	ND
<b>C9Z451</b>	SCAB_57751	Cellobiose-binding	0.25	0.04
<b>C9ZDW4</b>	SCAB_63891	ABC-type xylose transport system	0.08	0.08
<b>C9ZFW3</b>	SCAB_66031	Arabinofuranosidase	0.02	0.11
<b>C9YYE6</b>	SCAB_70551	Pectate lyase	ND	0.57
C9Z1A6	SCAB_71771	Glycosyl hydrolase	0.04	ND
<b>C9Z4J7</b>	SCAB_74141	$\alpha$ -N-furanosidase	ND	0.03
<b>C9Z623</b>	SCAB_74681	Licheninase	ND	0.11
<b>C9Z7Q2</b>	SCAB_75761	Chitinase	D	0.16

<b>C9ZE95</b>	SCAB_79251	Xylanase A	0.02	0.90
<b>C9YU11</b>	SCAB_81841	Glycosyl hydrolase	ND	0.03
<b>C9YU67</b>	SCAB_82421	Pectate lyase	ND	0.05
<b>C9Z1I5</b>	SCAB_85231	Chitinase	0.47	0.47
<b>C9Z804</b>	SCAB_89741	Cellulose-binding protein	0.27	0.09
<b>C9Z9L5</b>	SCAB_90081	Cellulase B	0.08	0.28
<b>C9Z9L6</b>	SCAB_90091	Cellulase	0.18	0.29
<b>C9Z9L7</b>	SCAB_90101	Cellulase	0.27	0.90
C9YY83	<i>tal</i>	Transaldolase	0.13	0.03
C9YY64	<i>tpiA</i>	Triosephosphate isomerase	0.41	0.28
<b>C9Z2V1</b>	<i>xlnB</i>	Endo-1.4- $\beta$ -xylanase	ND	0.12
C9YY82	<i>zwf</i>	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	0.09	0.04

Cell envelope biogenesis. outer membrane

C9YZB3	<i>argS</i>	Arginine--tRNA ligase	0.05	ND
<b>C9YT92</b>	SCAB_34981	Lipoprotein	0.19	0.19
<b>C9YXW3</b>	SCAB_38101	Secreted NLP/P60 family protein	0.34	0.07

<b>C9Z8V2</b>	SCAB_45141	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	0.20	0.07
<b>C9YWP7</b>	SCAB_69011	Lytic transglycosylase	0.10	ND

#### Defense mechanisms and virulence

C9Z785	SCAB_44161	$\beta$ -lactamase	0.15	0.17
<b>C9ZC23</b>	SCAB_46591	Copper-binding protein	0.06	ND
<b>C9YWG0</b>	SCAB_53111	Penicillin acylase	0.09	0.01
<b>C9Z160</b>	SCAB_56441	Protease	0.02	0.01
C9ZHH5	SCAB_66981	Serine protéase	0.08	ND
C9YYC2	SCAB_70311	TerD-like stress protein	0.14	0.14

#### Energy production and conversion

C9ZGJ3	<i>aceB1</i>	Malate synthase	D	0.03
C9Z8F0	<i>atpA</i>	ATP synthase subunit $\alpha$	0.10	0.08
<b>C9Z8E8</b>	<i>atpD</i>	ATP synthase subunit $\beta$	0.08	0.12
C9Z3T0	<i>coaD</i>	Phosphopantetheine adenylyltransferase	0.22	0.11

<b>C9YTU0</b>	<i>ctaC</i>	Cytochrome c oxidase subunit II	0.27	0.03
A0A086GNJ6	<i>ftsH</i>	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH	0.05	0.11
C9YUA4	<i>gap</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	ND	0.09
C9YY62	<i>gap</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0.22	0.22
A0A086GXF0	<i>mdh</i>	Malate dehydrogenase	0.23	0.11
A0A086GN65	<i>purA</i>	Adenylosuccinate synthetase	0.15	0.04
C9ZEP5	SCAB_16961	Oxidoreductase	0.03	0.10
C9ZGW6	SCAB_34651	Oxidoreductase	0.08	ND
C9YUX5	SCAB_36201	IMP dehydrogenase/ GMP reductase	0.25	D
C9Z0Q6	SCAB_39391	Monooxygenase	0.11	0.03
C9YWH5	SCAB_53261	Oxidoreductase	ND	0.09
C9YTR7	SCAB_67061	Dihydrolipoyl dehydrogenase	2.24	1.69
C9Z1E2	SCAB_72171	Acyl-CoA dehydrogenase	0.07	0.05
C9Z2T7	SCAB_72571	Molybdopterin oxidoreductase	ND	0.04
<b>C9ZE86</b>	SCAB_79151	Cytokinin dehydrogenase	ND	0.53

### Inorganic ion transport and metabolism

C9YTX8	<i>bfr</i>	Bacterioferritin	0.26	1.53
<b>C9ZFJ5</b>	<i>pstS</i>	High-affinity phosphate-binding protein	0.36	0.15
		Aliphatic sulfonate ABC transporter substrate-binding		
<b>C9YUK3</b>	SCAB_19841	protein	1.49	5.31
<b>C9Z7Z5</b>	SCAB_89631	Metallopeptidase	ND	0.06
C9Z7C8	<i>sodF2</i>	Superoxide dismutase	0.46	0.13

### Lipid transport and metabolism

C9YY49	<i>fadA2</i>	Acetyl-CoA C-acyltransferase	0.14	0.09
C9YWT7	<i>glpQ</i>	Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	0.27	1.00
<b>C9Z5Z2</b>	<i>glpQ3</i>	Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	ND	0.33
<b>C9ZG71</b>	SCAB_3021	Esterase A	0.09	0.06
<b>C9Z6Y6</b>	SCAB_28271	Cholesterol esterase	0.35	0.78
C9ZGV4	SCAB_34521	Enoyl-CoA hydratase	0.14	ND
<b>C9YTI0</b>	SCAB_50851	Lipoprotein	0.12	ND

<b>C9YTK3</b>	SCAB_51091	Esterase-lipase	D	0.70
<b>C9YWE9</b>	SCAB_53001	Lipoprotein	0.14	ND
<b>C9Z2K9</b>	SCAB_56951	Lipoprotein	ND	0.04
<b>C9Z1F6</b>	SCAB_72321	Lipase	ND	0.33

#### Nucleotide transport and metabolism

C9Z5G9	<i>dnaK</i>	Chaperone protein DnaK	0.17	0.08
<b>C9YUY5</b>	<i>groS</i>	10 kDa chaperonin	0.45	0.55
C9Z7F8	<i>ndk</i>	Nucleoside diphosphate kinase	0.47	0.60
A0A086H3W5	<i>purM</i>	Phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase	0.16	ND
<b>C9Z578</b>	SCAB_26841	Serine protéase	0.15	0.15
C9Z0R6	SCAB_39491	Clp-family ATP-binding protease	0.08	0.09
<b>C9ZGX4</b>	SCAB_49491	5'-nucleotidase	0.10	0.11
<b>C9YVK8</b>	SCAB_68841	5' nucleotidase	0.03	0.08

#### Posttranslational modification. protein turnover. chaperones

<b>C9Z4D5</b>	<i>fkfB</i>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	0.24	0.06
A0A086H3M7	IQ62_03295	Thioredoxin reductase	0.09	0.15
C9Z8G9	<i>lysA</i>	Diaminopimelate decarboxylase	ND	0.04
<b>C9YVY2</b>	SCAB_21061	Extracellular solute-binding receptor	0.06	ND
C9ZAJ2	SCAB_45651	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	0.37	ND
<b>C9YZU4</b>	SCAB_71211	Ssp-like secreted protease	0.02	0.17
C9Z7E9	<i>tig</i>	Trigger factor	ND	0.12

#### Signal transduction mechanism

A0A086GPC6	<i>pafA</i>	Pup--protein ligase	D	0.08
<b>C9Z0L9</b>	SCAB_24621	TerD-like stress protein	0.16	0.11
C9ZH47	SCAB_50261	TerD-like stress protein	2.30	1.10
C9ZE07	SCAB_64331	TerD-like stress protein	1.20	1.20
C9ZE08	SCAB_64341	TerD-like stress protein	0.70	0.30
<b>C9YXX5</b>	<i>scoF2</i>	Cold shock protein	ND	0.43

# Cell division and chromosome partitioning

<b>C9YWW9</b>	SCAB_82711	Serine/threonine protein kinase	0.05	0.03
---------------	------------	---------------------------------	------	------

# Coenzyme metabolism

C9Z1Y4	<i>cobN</i>	Cobalamin biosynthesis protein cobN	0.02	ND
--------	-------------	-------------------------------------	------	----

# Translation ribosomal structure and biogenesis

C9Z3N7	<i>frr</i>	Ribosome-recycling factor	0.29	0.10
C9YW93	<i>fusA</i>	Elongation factor G	ND	0.05
C9ZAS2	<i>glyS</i>	Glycine--tRNA ligase	ND	0.08
C9Z240	<i>gpsI</i>	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	0.06	0.11
A0A086GX93	<i>groEL</i>	60 kDa chaperonin	0.14	0.26
C9ZH64	<i>groL</i>	60 kDa chaperonin	0.25	0.51
C9Z4H8	<i>infC</i>	Translation initiation factor IF-3	0.12	0.12



C9YWA6	<i>rlpA</i>	50S ribosomal protein L1	0.15	0.23
C9YW75	<i>rlpB</i>	50S ribosomal protein L2	0.63	0.30
C9YW78	<i>rlpC</i>	50S ribosomal protein L3	0.70	0.48
C9YW77	<i>rlpD</i>	50S ribosomal protein L4	0.74	0.52
C9YW66	<i>rlpE</i>	50S ribosomal protein L5	0.76	0.19
C9YW63	<i>rlpF</i>	50S ribosomal protein L6	0.37	0.16
C9ZAN6	<i>rlpI</i>	50S ribosomal protein L9	0.75	0.81
C9YWA3	<i>rlpL</i>	50S ribosomal protein L7/L12	ND	0.15
<b>C9YW47</b>	<i>rlpM</i>	50S ribosomal protein L13	1.13	0.19
C9YW68	<i>rlpN</i>	50S ribosomal protein L14	0.85	0.23
C9YW59	<i>rlpO</i>	50S ribosomal protein L15	0.69	0.38
C9YW71	<i>rlpP</i>	50S ribosomal protein L16	0.13	0.25
C9YW62	<i>rlpR</i>	50S ribosomal protein L18	0.29	0.14
C9Z3Q3	<i>rlpS</i>	50S ribosomal protein L19	0.92	0.46
C9Z4I0	<i>rlpT</i>	50S ribosomal protein L20	0.50	0.71
C9Z7H2	<i>rlpU</i>	50S ribosomal protein L21	0.67	0.08
C9YW73	<i>rlpV</i>	50S ribosomal protein L22	0.77	0.15
C9YW76	<i>rlpW</i>	50S ribosomal protein L23	0.67	0.53

C9YW67	<i>rplX</i>	50S ribosomal protein L24	0.25	D
C9Z7H3	<i>rpmA</i>	50S ribosomal protein L27	0.44	0.44
C9Z0W7	<i>rpmB</i>	50S ribosomal protein L28	0.88	0.75
C9YW70	<i>rpmC</i>	50S ribosomal protein L29	0.50	ND
C9Z0W6	<i>rpmG</i>	50S ribosomal protein L33	0.67	0.33
<b>A0A086GP79</b>	<i>rpmI</i>	50S ribosomal protein L35	0.43	ND
<b>C9Z4H9</b>	<i>rpmI</i>	50S ribosomal protein L35	0.57	0.29
C9YW51	<i>rpoA</i>	DNA-directed RNA polymerase subunit $\alpha$	0.11	0.11
C9YWA2	<i>rpoB</i>	DNA-directed RNA polymerase subunit $\beta$	0.03	0.05
C9YWA1	<i>rpoC</i>	DNA-directed RNA polymerase subunit $\beta$	0.02	0.04
C9YWQ2	<i>rpsA</i>	30S ribosomal protein S1	0.22	0.22
C9Z3P0	<i>rpsB</i>	30S ribosomal protein S2	0.35	0.29
C9YW72	<i>rpsC</i>	30S ribosomal protein S3	0.30	0.30
C9YW61	<i>rpsE</i>	30S ribosomal protein S5	0.85	0.60
C9YW64	<i>rpsH</i>	30S ribosomal protein S8	0.29	0.07
C9YW46	<i>rpsI</i>	30S ribosomal protein S9	0.58	0.53
C9YW79	<i>rpsJ</i>	30S ribosomal protein S10	0.83	0.67
C9YW52	<i>rpsK</i>	30S ribosomal protein S11	0.36	0.29

C9YW95	<i>rpsL</i>	30S ribosomal protein S12	0.64	0.57
C9YW53	<i>rpsM</i>	30S ribosomal protein S13	0.57	0.21
C9Z241	<i>rpsO</i>	30S ribosomal protein S15	1.27	0.55
C9YW69	<i>rpsQ</i>	30S ribosomal protein S17	1.00	0.27
C9Z0W3	<i>rpsR</i>	30S ribosomal protein S18	0.78	0.56
C9YW74	<i>rpsS</i>	30S ribosomal protein S19	0.36	0.27
C9Z7I7	<i>rsfS</i>	Ribosomal silencing factor RsfS	0.18	ND
C9Z656	<i>rspD</i>	30S ribosomal protein S4	0.83	0.38
C9YW94	<i>rspG</i>	30S ribosomal protein S7	0.53	0.41
C9Z3Q6	SCAB_26181	RNA binding protein	0.44	0.11
C9Z0U6	<i>tilS</i>	tRNA(Ile)-lysidine synthase	ND	0.05
C9YW92	<i>tuf</i>	Elongation factor Tu	0.25	0.41

#### Transcription

C9Z459	<i>adpA</i>	A-factor-responsive transcriptional activator	ND	0.05
C9ZAK6	<i>dnaN</i>	DNA polymerase III subunit $\beta$	0.18	0.05
<b>C9Z719</b>	<i>f40</i>	Cold shock protein	0.43	0.43

C9Z110	<i>hup</i>	DNA-binding protein HU1/hs1	0.50	0.20
C9YZ53	SCAB_38351	AsnC-family transcriptional regulator	0.13	ND
C9Z3V0	SCAB_41311	Cyclic-nucleotide-binding protein	0.04	0.08
C9Z4R8	SCAB_87581	Cold shock protein	ND	0.30

#### Morphological differentiation

<b>C9ZD97</b>	<i>bldKB</i>	BldKB-like transport system extracellular solute-binding protein	0.02	0.06
C9ZD95	<i>bldKD</i>	BldKD oligopeptide ABC transporter subunit	ND	0.08

#### General function prediction only

<b>C9Z5T6</b>	<i>aroQ</i>	Chorismate mutase	ND	0.39
<b>C9ZA98</b>	<i>atrA</i>	Extracellular binding protein	0.91	0.76
C9ZBW2	<i>chcB</i>	Acyl CoA isomerase	0.07	0.07
C9Z5R8	<i>citA</i>	Citrate synthase	0.08	0.19
C9YTC3	<i>dhsA</i>	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	0.20	0.05

C9ZDY8	<i>fabC</i>	Acyl carrier protein	0.22	0.33
<b>A0A086GQX2</b>	IQ62_28930	Sulfate ABC transporter substrate-binding protein	ND	3.41
A0A086GPC9	<i>prcA</i>	Proteasome subunit $\alpha$	ND	0.11
C9Z7P0	<i>ribH</i>	6.7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase	0.24	ND
C9Z996	<i>rnz</i>	Ribonuclease Z	0.00	0.09
C9YVY6	<i>sacA</i>	Aconitate hydratase	0.13	0.20
<b>C9Z6L9</b>	SCAB_12481	Substrate-binding protein transport system associated	1.61	1.03
<b>C9Z871</b>	SCAB_13411	Oxidoreductase	0.22	0.46
<b>C9Z883</b>	SCAB_13541	Copper oxidase	ND	0.11
C9YYW7	SCAB_23091	Carbonic anhydrase	ND	0.29
C9Z233	SCAB_25181	B-lactamase	0.16	ND
<b>C9Z3N2</b>	SCAB_25941	Solute-binding transport system protein	0.13	ND
C9Z6S2	SCAB_27611	Phage tail sheath proteins	ND	0.07
C9Z6U1	SCAB_27801	Enoyl-coA hydratase/isomerase family protein	0.07	ND
<b>C9Z8G3</b>	SCAB_28911	Transcriptional regulator	0.05	ND
C9ZA89	SCAB_29781	2-oxoglutarate dehydrogenase	D	0.02
<b>C9ZBY7</b>	SCAB_31431	Transport system peptide-binding protein	ND	0.19
<b>C9ZBY9</b>	SCAB_31461	Transport system extracellular solute-binding protein	D	0.17

<b>C9ZF82</b>	SCAB_33691	Transglycosylase domain-containing	0.22	0.13
<b>C9ZGS4</b>	SCAB_34211	Galactose oxidase	0.03	0.17
<b>C9ZGU9</b>	SCAB_34471	Transferase lipoprotein	0.07	ND
<b>C9Z5M7</b>	SCAB_43121	Serine/threonine protein kinase	0.09	0.11
<b>C9Z722</b>	SCAB_43501	Carboxypeptidase	0.54	0.26
<b>C9Z760</b>	SCAB_43901	Secreted hydrolase	0.29	0.19
<b>C9Z770</b>	SCAB_44001	Protein-lysine 6-oxidase	0.05	ND
<b>C9ZAI3</b>	SCAB_45561	Serine/threonine protein kinase	0.03	ND
C9ZAQ7	SCAB_61831	Metalloendopeptidase	ND	0.13
		Binding-protein-dependent metal transporter ATP-		
C9ZAS0	SCAB_61971	binding subunit	ND	0.07
C9ZAT6	SCAB_62141	Pyruvate phosphate dikinase	ND	0.06
<b>C9ZAW6</b>	SCAB_62471	Aminopeptidase	0.02	0.20
C9ZCE7	SCAB_63371	Cyclase	ND	0.14
<b>C9ZDY5</b>	SCAB_64111	Lipoprotein	0.19	ND
C9ZFP0	SCAB_65281	O-methyltransferase	0.08	ND
C9ZHB0	SCAB_66321	F420-dependent NADP reductase	0.24	0.32
C9YTR6	SCAB_67051	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase	0.07	0.12

<b>C9YWU9</b>	SCAB_69531	Extracellular solute-binding protein	0.21	0.12
C9YY98	SCAB_70071	Cysteine desulfurase	0.07	ND
C9YZX7	SCAB_71571	Sporulation protein	0.10	0.03
<b>C9Z1G4</b>	SCAB_72401	Hydrolase	ND	0.19
<b>C9Z2V8</b>	SCAB_72781	Penicillin acylase	0.09	D
C9Z4G9	SCAB_73861	Aldehyde dehydrogenase	ND	0.08
<b>C9Z4H0</b>	SCAB_73871	Dehydrogenase	ND	0.11
<b>C9Z9G7</b>	SCAB_76661	Lipoprotein	0.18	0.09
<b>C9ZCL9</b>	SCAB_78431	Tripeptidylaminopeptidase	0.26	0.40
C9ZED0	SCAB_79611	Polyketide dehydratase component	ND	0.11
C9ZED4	SCAB_79651	Polyketide synthase	ND	0.01
C9ZED6	SCAB_79671	coA ligase	ND	0.04
<b>C9YU08</b>	SCAB_81811	Substrate-binding protein	0.13	ND
<b>C9Z047</b>	SCAB_84861	Amidase	0.09	0.12
<b>C9Z0C9</b>	<i>sti1</i>	Subtilase-type protease inhibitor	0.73	0.13
C9ZFY0	<i>thcA</i>	Aldehyde dehydrogenase	D	0.05
C9YY84	<i>tktA</i>	Transketolase	0.05	0.03
C9Z994	<i>tri1</i>	Protease	0.12	0.16

Unknown function

<b>C9Z3A4</b>	<i>sapA</i>	0.36	ND
<b>C9ZEJ5</b>	SCAB_2381	0.17	ND
<b>C9YUC2</b>	SCAB_4931	0.06	0.09
<b>C9YUE9</b>	SCAB_5221	0.43	0.95
<b>C9YX78</b>	SCAB_6661	0.40	0.27
<b>C9YYN8</b>	SCAB_7551	0.47	0.53
<b>C9YYQ6</b>	SCAB_7741	0.07	0.04
<b>C9Z0A6</b>	SCAB_8561	ND	0.31
<b>C9Z516</b>	SCAB_11521	0.24	0.03
<b>C9Z884</b>	SCAB_13551	0.19	ND
<b>C9ZGH4</b>	SCAB_18161	ND	0.17
<b>C9YT70</b>	SCAB_19641	0.07	0.05
<b>C9YUN3</b>	SCAB_20171	ND	0.09
<b>C9YVV6</b>	SCAB_20801	0.14	ND
<b>C9Z0I2</b>	SCAB_24201	0.19	0.14



<b>C9Z3M9</b>	SCAB_25911	0.23	0.38
<b>C9Z3S4</b>	SCAB_26361	0.12	0.03
<b>C9Z8L7</b>	SCAB_29411	0.26	0.11
C9ZGP0	SCAB_33871	0.33	ND
<b>C9ZGQ1</b>	SCAB_33981	1.90	2.03
<b>C9YTD0</b>	SCAB_35361	0.36	0.25
<b>C9YUT0</b>	SCAB_35731	0.58	0.33
<b>C9YW48</b>	SCAB_36641	0.16	ND
<b>C9YW90</b>	SCAB_37071	0.29	ND
C9YZ86	SCAB_38691	0.22	0.11
<b>C9YZA8</b>	SCAB_38901	0.29	ND
<b>C9YZD0</b>	SCAB_39131	0.19	ND
<b>C9Z0Q2</b>	SCAB_39351	ND	0.04
C9Z0R8	SCAB_39511	0.25	0.17
<b>C9Z0X0</b>	SCAB_40041	0.50	0.28
<b>C9Z0X8</b>	SCAB_40131	ND	0.06
<b>C9Z765</b>	SCAB_43951	0.15	ND
<b>C9Z7A3</b>	SCAB_44341	0.14	0.05

<b>C9Z8N7</b>	SCAB_44501	ND	0.25
<b>C9Z8P6</b>	SCAB_44591	0.12	ND
<b>C9Z8P9</b>	SCAB_44621	0.24	0.05
<b>C9Z8T0</b>	SCAB_44921	0.10	ND
<b>C9ZAJ3</b>	SCAB_45661	D	0.15
C9ZBZ4	SCAB_46281	0.09	0.45
<b>C9ZC25</b>	SCAB_46611	0.75	ND
<b>C9ZC26</b>	SCAB_46621	0.08	ND
<b>C9ZDS2</b>	SCAB_47931	0.05	ND
C9ZH08	SCAB_49851	0.36	0.36
<b>C9YTI5</b>	SCAB_50911	0.37	ND
<b>C9YTI6</b>	SCAB_50921	ND	0.14
<b>C9YV41</b>	SCAB_52001	0.64	0.39
C9YV96	SCAB_52561	0.26	0.05
<b>C9YY35</b>	SCAB_54421	0.12	0.06
C9Z173	SCAB_56571	ND	0.11
<b>C9Z2I9</b>	SCAB_56741	0.36	ND
C9Z2J2	SCAB_56771	0.17	0.33

<b>C9Z491</b>	SCAB_58181	0.15	ND
<b>C9Z4C4</b>	SCAB_58511	ND	0.07
C9Z7E2	SCAB_59881	0.29	ND
<b>C9ZDY2</b>	SCAB_64081	0.55	0.30
<b>C9ZE18</b>	SCAB_64451	0.10	0.02
C9ZFN9	SCAB_65271	0.29	0.21
<b>C9ZHF3</b>	SCAB_66761	0.82	0.50
<b>C9ZHGO</b>	SCAB_66831	0.13	0.13
<b>C9YTT6</b>	SCAB_67251	0.04	0.04
<b>C9YTX5</b>	SCAB_67651	0.20	0.04
<b>C9YVH7</b>	SCAB_68521	0.15	ND
<b>C9Z1G8</b>	SCAB_72441	D	1.42
<b>C9Z4J0</b>	SCAB_74081	0.02	0.13
<b>C9Z4K8</b>	SCAB_74261	0.26	ND
C9Z7K6	SCAB_75261	0.67	0.50
C9Z9C8	SCAB_76271	0.11	0.26
C9ZB66	SCAB_77921	0.05	ND
C9ZCQ1	SCAB_78761	ND	0.26

C9YU40	SCAB_82131	0.06	ND
<b>C9Z064</b>	SCAB_85031	0.33	0.44
C9Z1I8	SCAB_85261	ND	0.13
C9Z689	SCAB_88231	0.10	0.06
<b>C9Z9T4</b>	SCAB_90811	0.23	0.59
<b>C9Z9U4</b>	SCAB_90901	D	0.67

Proteins produced by *Streptomyces scabiei* EF-35 during growth in a medium supplemented with cellobiose (CM+Ce) or both cellobiose and suberin (CM+Ce+S)

<sup>a</sup> The normalized spectral count (NSpC) is obtained by dividing the spectral count by the molecular weight of the protein

<sup>b</sup> ND: Non detected

<sup>c</sup> Proteins in **bold** have a predicted extracellular localization.

<sup>d</sup> D: Detected. Peptides have not fulfilled the filtering criteria as described in the Material and Methods section.

## CHAPITRE 4

### DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

Les *Streptomyces* sont connus pour produire et sécréter une grande quantité d'enzymes hydrolytiques, telles que cellulases, xylanases et autres glycosyl hydrolases considérant leur mode de vie saprophytique (Joshi *et al.*, 2010 ; Lauzier *et al.*, 2008 ; Pagé *et al.*, 1996 ; Ruiz-Arribas *et al.*, 1997 ; Tsujibo *et al.*, 1997). Ces glycosyl hydrolases sont essentiellement induites par des polysaccharides capables d'être dégradés par ces mêmes enzymes (MacKenzie *et al.*, 1987 ; Godden *et al.*, 1989, Fatokun *et al.*, 2016). *Streptomyces scabiei* possède 263 gènes de glycosyl hydrolases et parmi ces gènes, 26 correspondent à des cellulases. Cependant, il est assez étonnant qu'un polymère ne contenant pas de sucres comme la subérine puisse induire des glycosyl hydrolases (Komeil *et al.*, 2014). Notre première hypothèse de travail stipulait que la capacité de la subérine à induire la production d'enzymes classées comme des glycosides hydrolases n'était pas due au fait que certains résidus de la paroi cellulaire (cellulose et hémicellulose) restent accrochés à la subérine lors de son extraction. Beaulieu *et al.* (2016) ont mis en évidence la quantité de polysides présents dans la subérine après sa purification. Nous pouvons remarquer une faible quantité de sucres (entre 2,5 et 8 mg mg de périderme<sup>-1</sup>). Il faut remarquer que la quantité de sucres restant dans la subérine après purification est infime (mg) par rapport à la quantité de sucres ajoutés dans le milieu de culture de la bactérie (g). Néanmoins, la subérine induit mieux de glycosyl hydrolases que la cellulose (Padilla-Reynaud *et al.*, 2015).

Nous avons pu mettre en évidence que les glycosyls hydrolases produites par *S. scabiei* en présence de subérine étaient actives puisque nous avons observé une dégradation de différents substrats (carboxymethylcellulose, cellulose microcristalline, xylane, lichenine) proposés à *S. scabiei*. De plus, nous avons répondu à notre deuxième hypothèse en démontrant que l'ajout de subérine dans

le milieu augmentait la quantité de glycosyl hydrolases dont les cellulases. Nos travaux apportent une explication au fait qu'il avait été rapporté que *S. scabiei* ne produisait pas ou peu de cellulases (Joshi *et al.*, 2007). La présence de cellulose seule ne constituant pas une bonne condition de production de cellulases. Cela suggère que le cellobiose n'est pas un bon inducteur de l'expression des gènes de cellulases chez *S. scabiei*, ce que nous avons par ailleurs confirmé.

Les travaux de protéomique ont mis en évidence la présence d'une protéine qui pourrait jouer un rôle dans la différenciation cellulaire de la bactérie. Nous avons retrouvé en grande quantité (26% du sécrétome de *S. scabiei*) une protéine inhibitrice des subtilases dans le milieu supplémenté par la cellulose. L'ajout de subérine dans le milieu fait diminuer la quantité de cet inhibiteur de protéase (1,15%) et augmenter la quantité de cellulases sécrétées. Les *Streptomyces* possédant une biologie extracellulaire complexe, les mécanismes où les inhibiteurs des protéases sont impliqués ne sont pas encore tous élucidés. Toutefois, il est connu que des inhibiteurs de protéases jouent un rôle dans la différenciation cellulaire. Les inhibiteurs de protéases vont inhiber les protéases et empêcher l'autolyse, ainsi, la bactérie va rester en phase végétative (Chater *et al.*, 2010). La production de thaxtomines en phase végétative pourrait être minimale puisqu'il s'agit d'un métabolite secondaire. La subérine permettrait de lever du moins partiellement la phase végétative (Lerat *et al.*, 2010). Nous proposons un nouveau modèle pour expliquer la fonction de la subérine et de la cellulose dans l'induction des mécanismes de défense de la bactérie:

Cas 1) Lorsque la bactérie est en présence uniquement de subérine : il y a peu d'inhibiteurs de protéases, donc autolyse des hyphes. Ceci donne à la bactérie un signal de différenciation cellulaire d'où le passage en métabolisme secondaire, donc synthèse d'une petite quantité de thaxtomines A car l'inducteur des gènes de biosynthèse de la toxine, le cellobiose (Johnson *et al.*, 2007 ; Joshi *et al.*, 2007) est peu présent.

Cas 2) Lorsque la bactérie est en présence uniquement de cellulose : il y a synthèse des inhibiteurs de protéases, le signal de différenciation cellulaire et de métabolisme secondaire est alors absent. Il a été démontré par Bignell *et al.* (2014) que plusieurs gènes *bld* associés à la différenciation cellulaire étaient effectivement nécessaires à la production de thaxtomines. La faible production de thaxtomine dans ces conditions serait due à une faible production des cellulases qui relâcherait un peu de cellobiose.

Cas 3) La bactérie est en présence de cellobiose et de subérine : la subérine contrecarre la production des inhibiteurs de protéases et active la différenciation cellulaire et la synthèse des métabolites secondaires, dont la thaxtomine A. La cellulose et la subérine vont par ailleurs induire la synthèse d'une grande quantité de cellulases. La disponibilité de cellobiose ainsi que l'entrée en phase de différenciation cellulaire vont permettre à la bactérie de synthétiser une grande quantité de thaxtomines A.

En conclusion, nous avons mis en évidence que la subérine ainsi que la cellulose vont jouer un rôle essentiel dans la mise en place de la maladie puisque la présence des deux polymères va induire une plus grande quantité de production de la thaxtomine A, qui est essentielle à la virulence (Goyer *et al.*, 1998) et pour développer la maladie (King *et al.*, 1989 ; Lawrence *et al.*, 1990 ; Healy *et al.*, 2000 ). Pour confirmer l'importance de l'inhibiteur de protéase SCAB\_8801 qu'on soupçonne être inactivé par la subérine, il serait intéressant de faire une délétion du gène. Le mécanisme moléculaire par lequel la subérine induit la différenciation cellulaire et le mécanisme secondaire est également inconnu. Pour avoir une meilleure idée de la régulation des enzymes cellulolytiques induites par la subérine il serait important de faire des gels de retardement. Avec des promoteurs des gènes de cellulase marqués, on pourrait mettre en évidence des protéines régulatrices des cellulases induites lorsque la subérine est présente dans le milieu de croissance de *S. scabiei*.

Dans le deuxième volet de cette thèse, nous tentions de répondre à la troisième hypothèse de la thèse à savoir que le cellobiose ne serait pas un bon inducteur des gènes de cellulases chez les *Streptomyces* phytopathogènes. L'activité cellulolytique ainsi que l'expression génétique des cellulases étaient plus importantes dans le milieu contenant la subérine chez *S. scabiei* souche EF-35 et 87.22, que dans le milieu contenant le cellobiose. Cependant, les deux autres *Streptomyces* pathogènes testés n'ont pas répondu de la même façon vis-à-vis de la subérine. Les gènes codant pour les cellulases retrouvées dans le surnageant de *S. scabiei* EF-35 ont un site de liaison pour la protéine CebR qui s'avère être un répresseur du catabolisme des cellulases chez les *Streptomyces* (Schlösser *et al.*, 1999). La protéine CebE qui est une protéine impliquée dans le transport et la liaison du cellobiose est sous le contrôle de la protéine CebR (Jourdan *et al.*, 2016). Ainsi, nous avons trouvé dans le sécrétome de *S. scabiei* EF-35 que la protéine CebE était moins exprimée lorsque la subérine était ajoutée dans le milieu contenant le cellobiose. Ceci nous laisse penser que la subérine joue un rôle dans la régulation de la production de cellulases puisque la diminution de la protéine CebE en présence de la subérine augmente la quantité de cellobiose libre. Ces résultats sont en accord avec ceux décrits dans le chapitre II. La subérine est impliquée dans la différenciation cellulaire, la régulation des cellulases et la production de la thaxtamine A.

Puisque les autres *Streptomyces* pathogènes n'ont pas la même réponse vis-à-vis de la subérine, nous formulons l'hypothèse que *Streptomyces scabiei* est mieux adapté à son hôte, la pomme de terre que les autres pathogènes. En effet, lors de l'infection du tubercule, la bactérie rencontre tout d'abord le périoderme de la pomme de terre composé de subérine. Ainsi, la régulation des enzymes cellulolytiques par la subérine est une adaptation que *S. scabiei* aurait développé pour mieux coloniser son hôte et dégrader les composés cellulotiques présents dans la paroi cellulaire du périoderme de la pomme de terre. De plus, la biosynthèse des enzymes cellulolytiques induites par la subérine va permettre à la bactérie de se procurer du



cellobiose, qui en combinaison avec la subérine va augmenter la production de thaxtomine A, essentielle au développement de la maladie de la gale commune de la pomme de terre. Alors qu'il a été rapporté que *S. scabiei* ne dégradait pas la cellulose (Johnson *et al.*, 2007), une étude récente a mis en évidence que le génome de *S. scabiei* possède un groupe de gènes CAZy qui ont des similitudes avec des gènes des espèces de *Streptomyces* connues pour dégrader très efficacement la cellulose (Book *et al.*, 2016). De plus, il a été démontré récemment que la bactérie peut dégrader très efficacement la cellulose encastree dans les parois cellulaires subérisées (Beaulieu *et al.*, 2016).

Finalement pour connaître si les cellulases de *S. scabiei* sont essentielles à la virulence, il serait intéressant de faire des mutants en faisant des interruptions géniques ou des surexpressions des gènes des cellulases qui sont présents en présence de subérine.

Les travaux présentés dans cette thèse nous ont permis d'émettre des hypothèses sur la façon dont *Streptomyces scabiei* réagit lorsqu'il est en présence de subérine et des polysaccharides présents dans la paroi cellulaire des cellules du périoderme de la pomme de terre. La communauté scientifique a longtemps cru que *S. scabiei* se procurait le cellobiose (nécessaire pour la synthèse de thaxtomine A) lors que la bactérie colonnaisait des plantes en croissance. Nous avons pu mettre en évidence que *S. scabiei* sécrétait des cellulases capables de dégrader différents substrats. Ainsi, les cellulases sécrétées, permettent à la bactérie de se procurer du cellobiose. De plus, il semblerait que la subérine joue un rôle dans la régulation des cellulases. Nous avons observé que l'ajout de subérine dans le milieu n'a pas d'effet sur l'expression relative des gènes des cellulases testés chez d'autres *Streptomyces* pathogènes (*S. acidiscabies* et *S. turgidiscabies*). Cependant chez *S. scabiei* la présence de subérine dans le milieu augmente significativement l'expression relative des gènes de cellulases. *S. scabiei*, a été identifié en premier comme le *Streptomyces* pathogène causant la gale commune de la pomme de

terre. Avec les résultats présentés dans cette thèse nous pouvons supposer que *S. scabiei* a évolué très étroitement avec son hôte et que la bactérie s'est mieux adapté à celui-ci. Les autres *Streptomyces* pathogènes tels que *S. acidiscabies* et *S. turgidiscabies* ne semblent pas être aussi efficaces que *S. scabiei* pour dégrader le périderme de la pomme de terre et sa subérine.

## BIBLIOGRAPHIE

Abdallah, A.M., Verboom, T., Hannes, F., Safi, M., Strong, M., Eisenberg, D., Musters, R.J., Vanderbroucke-Grauls, C.M., Appelmelk, B.J., Lurink, J., *et al.* 2006. A specific secretion system mediates PPE41 transport in pathogenic mycobacteria. *Mol. Microbiol.* 62, 667-679.

Adams, M.J., and Lapwood, D.H. (1978). Studies on the lenticel development, surface microflora and infection by common scab (*Streptomyces scabies*) of potato tubers growing in wet and dry soils. *Ann. Appl. Biol.* 90, 335-343.

Agrios, G. (2005). *Plant Pathology*. 5th Ed. Academic Press, San Diego, CA, USA.

Agriculture, Pêcheries et Alimentation Québec, (2011) <http://www.mapaq.gouv.qc.ca/fr/Publications/Monographiepommedeterre.pdf>.

Angelini, S., Deitermann, S., and Koch, H.-G. (2005). FtsY, the bacterial signal-recognition particle receptor, interacts functionally and physically with the SecYEG translocon. *EMBO Rep.* 6, 476-481.

Bacic, A., Harrys, P.J., Stone, B.A. (1988). Structure and function of plant cell wall. In *The Biochemistry of Plants* (ed. P.K. Stumpf and E. E. Conn). Academic Press. 14, 297-371.

Bao, K., and Cohen, S.N. (2003). Recruitment of terminal protein to the ends of *Streptomyces* linear plasmids and chromosomes by a novel telomere binding protein essential for linear DNA replication. *Genes Dev.* 17, 774-785.

Babcock, M. J., Eckwall, E., and Schottel, J.L. (1993). Production and regulation of potato-scab-inducing phytotoxins by *Streptomyces scabies*. *J. Gen. Microbiol.* 139, 1579- 1586.

Barry, S.M., Kers, J.A., Johnson, E.G., Song, L., Aston, P.R., Patel, B., Krasnoff, S.B., Crane, B.R., Gibson, D.M., Loria, R. and Challis, G.L. (2012). Cytochrome P450-catalyzed L-tryptophan nitration in thaxtomin phytotoxin biosynthesis. *Nat. Chem. Biol.* 8, 814-816.

Beaulieu, C., Sidibé, A., Jablone, R., Simao-Beaunoir, A.-M., Lerat, S., Monga, E., and Bernards, M.(2016). Physical, chemical and proteomic evidence of potato suberin degradation by the plant pathogenic bacterium *Streptomyces scabiei*. *Microbes Environ.* 31, 427-434.

Beauséjour, J., Goyer, C., Vachon, J., and Beaulieu, C. (1999). Production of thaxtomin A by *Streptomyces scabies* strains in plant extract containing media. *Can. J. Microbiol.* 45, 764-768.

Bender, C.L., Alarcon-Chaidez, F., and Gross, D.C. (1999). *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 266–292.

Benson, D.R., and Silvester, W.B. (1993). Biology of Frankia strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiol. Rev.* 57, 293-319.

Berdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot (Tokyo)* 58: 1-26.

Berks, C. Ben., Sargent, F. and Palmer, T. (2000). The Tat protein export pathway. *Mol. Biol.* 35, 260-274.

Berks, B.C. (1996). A common export pathway for proteins binding complex redox factors? *Mol. Microbiol.* 22, 393-404.

Bernards, M.A. and Razem, F.A. (2001). The poly (phenolic) domain of potato suberin: A non-lignin cell wall bio-polymer. *Phytochemistry* 57, 1115-1122.

Bernards, M.A. (2002). Demystifying suberin. *Can. J. Bot.* 80, 227-240.

Bignell, D.R.D., Huguet-Tapia, J.C., Joshi, M.V., Pettis, G.S., and Loria, R. (2010). What does it take to be a plant pathogen: genomic insights from *Streptomyces* species. *Anton. Leeuw.* 98, 179-194.

Bignell, D. R., Francis, I.M., Fyans J.K., and Loria, R. (2014). Thaxtomin A production and virulence are controlled by several *bld* gene global regulators in *Streptomyces scabies*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 27, 875-885.

Bischoff, V., Cookson, S.J., Wu, S., and Scheible, W.R. (2009) Thaxtomin A affects CESA-complex density, expression of cell wall genes, cell wall composition, and causes ectopic lignification in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *J. Exp. Bot.* 60, 955–965.

Blaszczyk, W., Chrzanowski, M., Fomal, J., Zimnoch-Guzowski, E., Palacios, M.C., and Vacek, J. (2005). Scanning electron microscopic investigation of different types of necroses in potato tubers. *Food Control* 16, 1A1-152.

Bogsch, E., Sargent, F., Stanley, N.R., Berks, B.C., Robinson, C., and Palmer, T. (1998). An essential component of a novel bacterial protein export system with homologues in plasmids and mitochondrial. *J. Biol. Chem.* 273, 18003-18006.

Book, A.J., Lewin, G.R., McDonald, B.R., Takasuka, T.E., Wendt- Pienkowski, E., Doering, D.T., Suh, S., Raffa, K.F., Fox, B.G., and Currie, C.R. (2016). Evolution of high cellulolytic activity in symbiotic *Streptomyces* through selection of expanded gene content and coordinated gene expression. PLoS Biol. 14.

Bornscheuer, U.T. (2002). Microbial carboxyl esterases: Classification, properties and application in biocatalysis. FEMS Microbiol. Rev. 26, 73-81.

Bown, L., Altowairish, M.S., Fyans, J.K., and Bignell, D.R.D. (2016). Production of the *Streptomyces scabies* coronafacoyl phytotoxins involves a novel biosynthetic pathway with an F<sub>420</sub>-dependent oxidoreductase and a short-chain dehydrogenase/reductase. Mol. Microbiol. 101, 122-135.

Brown C.R. (1993). Origin and history of the potato. Am. Potato J. 70, 363-373.

Chater, K. F., Biro, S., Lee, K. J., Palmer, T. and Schrempf, H. (2010). The complex extracellular biology of *Streptomyces*. FEMS Microbiol. Rev. 34, 171-198.

Chen, S., and Wilson, D.B. (1995) Proteomic and transcriptomic analysis of extracellular proteins and mRNA levels in *Thermobifida fusca* grown on cellobiose and glucose. J. Bacteriol. 189, 6260-6265.

Chen, S. and Wilson, D.B. (2007). Proteomics and transcriptomic analysis of extracellular proteins and mRNA levels in *Thermobifida fusca* grown on cellobiose and glucose. J. Bacteriol. 189, 6260-6265.

Chen, Z., Hong, X., Zhang, H., Wang, Y., Li, X., Zhu, J., and Gong, Z. (2005). Disruption of the cellulose synthase gene, *atcesa8/irx1*, enhances drought and osmotic stress tolerance in Arabidopsis. Plant J. 43, 273-283.

Chen, S., Tong J., Woodard, R.W., Du, G., Wu, J. and Chen, J. (2008). Identification and characterization of bacterial cutinase. J. Biol. Chem. 283, 25854-25862.

Chen, S., Su, L.Q., Billig, S., Zimmermann, W., Chen, J., and Wu, J. (2010). Biochemical characterization of the cutinases from *Thermobifida fusca*. J. Mol. Catal. B. Enzym. 63,121-127.

Clermont, N., Legault, G., Lerat, S., Beaulieu, C. (2010). Effect of biopolymers on geldamycin production and biocontrol ability of *Streptomyces melanosporofaciens* strain EF-76. Can. J. Plant. Pathol. 32, 481-489.

Cosgrove, D.J., (2000). Expansive growth of plant cell walls. Plant Physiol. Biochem. 38, 109-124.

Cosgrove, D.J. (2005). Growth of the plant cell wall. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 850-861.

Crawford, D.L., and Crawford, R.L. (1980). Microbial degradation of lignin. *Enzyme and microbial technology. Enzyme. Microb. Tech.* 2, 11-22.

Dallaire, C. (2007). Les agents pathogènes (*Streptomyces* et *Spongospora*) responsables des gales que l'on retrouve chez la pomme de terre. <http://www.Agrireseau.qc.ca>.

Dashtban, M., Schraft, H., and Qin, W. (2009). Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; Opportunities and perspectives. *Int. J. Biol. Sci.* 5, 578-595.

De Buck, E., Lammertyn, E., and Anné, J. (2008). The importance of the twin-arginine translocation pathway for bacterial virulence. *Trends Microbiol.* 16, 442-453.

De Leeuw, E., Te Kaat, K., Moser, C., Menestrina, G., Demel, R., De Kruijff, B., Oudega, B., Luirink, J., and Sinning, I. (2000). Anionic phospholipids are involved in membrane association of FtsY and stimulate its GTPase activity. *EMBO J.* 19, 531-541.

Dilks, K., Rose, R.W., Hartmann, E., and Pohlschroder, M. (2003). Prokaryotic utilization of the twin-arginine translocation pathways: a genomic survey. *J. Bacteriol.* 185, 1478-1483.

Driessen, A.J. and Nouwen, N. (2008). Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 643-667.

Dröse, S. (1993). Inhibitory effect of modified bafilomycins and concanamycins on P- and V-type adenosinetriphosphatases. *Biochemistry.* 32, 3902-3906.

Drouin J.F., Louvel, L., Vanhoutte, B., Vivier, H., Ponset, M.N., and Germain, P. (1997). Quantitative characterization of cellular differentiation of *Streptomyces ambofaciens* submerged culture by image analysis. *Biotechnol. Tech.* 11, 819-824.

Duval, I., Brochu, V., Simard, M., Beaulieu, C., and Beaudoin, N. (2005). Thaxtomin A induces programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension-cultured cells. *Planta.* 222, 820–831.

Dyson, P. (2011). *Streptomyces: Molecular Biology and Biothechnology*. Institute of life Science School Medicine. Swansea University, UK.

Errakhi, R., Dauphin, A., Meimoun, P., Lehner, A., Reboutier, D., Vatsa, P., Briand, J., Madiona, K., Rona, J.P., Barakate, M., Wendehenne, D., Beaulieu, C., and Bouteau, F. (2008). An early  $\text{Ca}^{2+}$  influx is a prerequisite to thaxtomin A-induced cell death in *Arabidopsis thaliana* cells. *J. Exp. Bot* 59, 4259– 4270.

Espelie, K.E., Davis, R.W., and Kolattukudy, P.E. (1980). Composition, ultrastructure and function of the cutin- and suberin-containing layers in the leaf, fruit peel, juice-sac and inner seed coat of grapefruit (*Citrus paradisi* Macfed.). *Planta* 149, 498-511.

FAOSTAT-Agriculture. (2007). <http://www.fao.org/>.

Fatokun, E.N., Nwodo, U.U. and Okoh, A.I. (2016). Classical optimization of cellulase and xylanase production by marine *Streptomyces* species, *Appl. Sci.* 6

Fayad, K.P., Simao-Beaunoir, A-M., Gauthier, A., Leclerc, C., Mamady, H., Beaulieu, C., Brzezinski, R. (2001). Purification and properties of a  $\beta$ -1,6-glucanase from *Streptomyces* sp. EF-14, an actinomycete antagonistic to *Phytophthora* spp. *Appl. Microbiol. Biot.* 57, 117-123.

Flärdh, K., and Buttner, M.J. (2009). *Streptomyces* morphogenics: Dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 36-49.

Francis, I.M., Jourdan, S., Fanara, S., Loria, R., and Rigal, S. (2015). The cellobiose sensor CebR is the gatekeeper of *Streptomyces scabiei* pathogenicity. *MBio.* 6:e02018-14.

Franke RB, Dombrink I, Schreiber L. (2012). Suberin goes genomics: use of a short living plant to investigate a long lasting polymer. *Front Plant Sci.* 3,4.

Fry, B.A., and Loria, R. (2002). Thaxtomin A: Evidence for a plant cell wall target. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 60, 1-8.

Fyans, J.K., Bignell, D., Loria, R., Toth, I., and Palmer, T. (2013). The ESX/type VII secretion system modulates development, but not virulence, of the plant pathogen *Streptomyces scabies*. *Mol. Plant Pathol.* 14, 119-30.

Fyans, J.K., Altowairish, M.S., Li, Y. and Bignell, D.R.D. (2015). Characterization of the coronatine-like phytotoxins produced by the common scab pathogen *Streptomyces scabies*. *Mol. Plant. Microbe In.* 28, 443-454.

Gandini, A., Neto, C.P., and Silvestre, A.J.D. (2006). Suberin: A promising renewable resource for novel macromolecular materials. *Prog. Polym. Sci.* 31, 878-892.

Godden, B., T. Legon, P. Helvestein, and M. Pennickx. (1989). Regulation of the production of hemicellulolytic and cellulolytic enzymes by a *Streptomyces* sp. Growing on lignocellulose. J. Gen. Microbiol. 135, 285-292.

Goyer, C., Faucher, E., and Beaulieu, C. (1996). *Streptomyces cavigabies* sp. nov., from deep-pitted lesions in potatoes in Quebec, Canada. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 46, 635-639.

Goyer, C., and Beaulieu, C. (1997). Host range of *Streptomyces* strains causing common scab. Plant Dis. 81, 901-904.

Goyer, C., Vachon, J., and Beaulieu, C. (1998). Pathogenic behavior of *Streptomyces scabies* mutants altered in Thaxtomin A production. Phytopathology 88, 442-445.

Güssow, H.T. (1914). The systematic position of the organism of the common scab. Science. 39, 431-432.

Graça, J., and Pereira, H. (2000). Suberin structure in potato periderm: glycerol, longchain monomers, and glyceryl and feruloyl dimers. J. Agric. Food Chem. 48, 5476-5483.

Graça, J., and Santos, S. (2007). Suberin: A biopolyester of plants' skin. Macromol. Biosci. 7, 128-135.

Graça, J. (2015). Suberin: the biopolyester at the frontier of plants. Front Chem. 3.

Graça, J., Cabral, V., Santos, S., Lamosa, P., Serra, O., Molinas, M., Schreiber, L., Kauder, F., and Franke, R. (2015). Partial depolymerization of genetically modified potato tuber periderm reveals intramolecular linkages in suberin polyester. Phytochemistry. 117, 209-219.

Harchand, R.K., and S. Singh. (2001). Induction of cellulases in *Streptomyces albaduncus* by different substrates. Indian J. Microbiol. 41, 45-49.

Hartmann, K., Peiter, E., Koch, K., Schubert, S., and Schreiber, K. (2002). Chemical composition and ultrastructure of broad bean ( *Vicia faba*L.) nodule endodermis in comparison to the root endodermis. Planta 215, 14-25.

Healy, F.G., King, R.R., and Loria, R. (1997). Identification of thaxtomin A nonproducing mutants of *Streptomyces scabies*. Phytopathology, 87, S41.

Healy, F.G., Wach, M., Krasnoff, S.B., Gibson, D.M., and Loria, R. (2000). The *txtAB* genes of the plant pathogen *Streptomyces acidiscabies* encode a peptide



synthetase required for phytotoxin thaxtomin A production and pathogenicity. *Mol. Microbiol.* 38, 794-804.

Healy, F.G., Krasnoff, S.B., Wach, M., Gibson, D.M., and Loria R. (2002). Involvement of a cytochrome P450 monooxygenase in thaxtomin A biosynthesis by *Streptomyces acidiscabies*. *J. Bacteriol.* 184, 2019–2029.

von Heijne, G., and Abrahmsen, L. (1989). Species-specific variation in signal peptide design Implications for protein secretion in foreign hosts. *FEBS Lett.* 244, 439-446.

Henrissat, B., Callebaut, I., Fabrega, S., Lehn, P., Mornon, J.-P., and Davies, G. (1995). Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases. *P. Natl. Acad. Sci USA.* 92, 7090-7094.

Henrissat, B. and Davies, G. (1997). Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr. Opin. Struc Biol.* 7, 637-644.

Henrissat, B., and Davies, G.J. (2000). Glycoside hydrolases and glycosyltransferases. Families, modules, and implications for genomics. *Plant Physiology.* 124, 1515-1519

Hernandez-Blanco, C., Feng, D.X., Hu, J., Sanchez-Vallet, A., Deslandes, L., Llorente, F., Berrocal-Lobo, M., Keller, H., Barlet, X., Sanchez-Rodriguez, C., Anderson, L.K., Somerville, S., Marco, Y., and Molina, A. (2007). Impairment of cellulose synthases required for *Arabidopsis* secondary cell wall formation enhances disease resistance. *Plant Cell.* 19, 890-903.

Hill, J., and Lazarovits, G. (2005). A mail survey of growers to estimate potato common scab prevalence and economic loss in Canada. *Can. J. Plant Pathol.* 27, 46-52.

Hodgson, D.A. 2000. Primary metabolism and its control in *Streptomyces*: A most unusual group of bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* 42, 47-238.

Hooker W.J. (1981). Compendium of potato diseases. *Am. Phytopathol. Soc. Saint Paul, Minnesota.* 125.

Hopwood, D. A. (2007a) How do antibiotic-producing bacteria ensure their self-resistance before antibiotic biosynthesis incapacitates them?. *Mol. Microbiol.* 63, 937-940.

Hopwood, D.A. (2007b). *Streptomyces* in Nature and Medicine: The Antibiotic Makers. Oxford University Press, New York.

Huss, M. and Wieczorek, H. (2009). Inhibitors of V-ATPases: Old and new players. *J. Exp. Biol.* 212, 341-346.

Jarrige, R., Ruckebusch, Y., Demarquilly, C., Farce, M.-H., Farce and Jourmet, M. (1995). Nutrition des ruminants domestiques. INRA. Paris. France.

Johnson, E.G., Joshi, M.V., Gibson, D.M., Loria, R. (2007). Cello-oligosaccharides released from host plants induce pathogenicity in scab-causing *Streptomyces* species. *Physiol. Mol. Plant P.* 71, 18-25.

Johnson, E.G., Krasnoff, S.B., Bignell, D.R., Chung, W.C., Tao, T., Parry, R.J., Loria, R., and Gibson, D.M. (2009). 4-Nitrotryptophan is a substrate for the non-ribosomal peptide synthetase TxtB in the thaxtomin A biosynthetic pathway. *Mol. Microbiol.* 73, 409–418.

Joshi, M.V., Bignell, D.R.D., Johnson, E.G., Sparks, J.P., Gibson D.M., and Loria, R. (2007b). The AraC/XylS regulator TxtR modulates thaxtomin biosynthesis and virulence in *Streptomyces scabies*. *Mol. Microbiol.* 66, 633-642.

Joshi, M.V., Mann, S.G., Antelmann, H., Widdick, D.A., Fyans, J.K., Chandra, G., Hutchings, M.I., Toth, I., Hecker, M., Loria, R. and Plamer, T. (2010). The twin arginine protein transport pathway exports multiple virulence proteins in the plant pathogen *Streptomyces scabies*. *Mol. Microbiol.* 77, 252-271.

Jourdan, S., Francis, I.M., Kim, M.J., Salazar, J.J.C., Planckaert, S., Frère, J.-M., Kerff, F., Devreese, B., Loria, R., and Rigali, S. (2016). The CebE/MsiK transporter is a doorway to the cello-oligosaccharide-mediated induction of *Streptomyces scabies* pathogenicity. *Sci. Rep.* 6, 27144.

Katsir, L., Chung, H.S., Koo, A.J., and Howe, G.A. (2008a). Jasmonate signaling: a conserved mechanism of hormone sensing. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 428–435.

Katsir, L., Schillmiller, A.L., Staswick, P.E., He, S.Y., and Howe, G.A. (2008b). COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105, 7100–7105.

Kers, J.A., Wach, M.J., Krasnoff, S.B., Widom, J., Cameron, K.D., Bukhalid, R.A., Gibson, D.M., Crane, B.R., and Loria, R. (2004). Nitration of a peptide phytotoxin by bacterial nitric oxide synthase. *Nature.* 429, 79-82.

van Keulen, G., Jonkers, H.M., Claessen, D., Dijkhuizen, L., and Wôston, H.A.B. (2003). Differentiation and anaerobiosis in standing liquid cultures of *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* 185, 1455-1458.

Kinashi, H., Someno, K., and Sakaguchi, K. (1984). Isolation and characterization of concanamycins A, B and C. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 37, 1333–1343.

King, R.R., Lawrence, C.H., Clark, M.C., and Calhoun, L.A. (1989). Isolation and characterization of phytotoxins associated with *Streptomyces scabies*. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 13, 849-850.

King, R.R., Lawrence, C.H., and Calhoun, L.A. (1992). Chemistry of phytotoxins associated with *Streptomyces scabies*, the causal organism of potato common scab. *J. Agric. Food Chem.* 40, 834-37.

King, R.R., Harold Lawrence, C., Calhoun, L.A., Ristaino, J.B. (1994). Isolation and characterization of thaxtomin-type phytotoxins associated with *Streptomyces ipomoeae*. *J. Agric. Food Chem.* 42, 1791-1794.

King, R.R., and Calhoun, L.A. (2009). The thaxtomin phytotoxins: sources, synthesis, biosynthesis, biotransformation and biological activity. *Phytochemistry*. 70, 833-841.

de Klerk, A., McLeod, A., Faurie, R., and van Wyk, P.S. (1997). Net blotch and necrotic warts caused by *Streptomyces scabies* on pods of peanut (*Arachis hypogaea*). *Plant Dis.* 81, 958.

Kolattukudy, P.E. (1980). Biopolyester membranes of plants-cutin and suberin. *Science*. 208, 990-1000.

Kolattukudy, P.E. (1984). Biochemistry and function of cutin and suberin. *Can. J. Bot.* 62, 2918-2933.

Komeil, D., A.-M. Simao-Beaunoir, and C. Beaulieu. (2013). Detection of potential suberinase-encoding genes in *Streptomyces scabiei* strains and other actinobacteria. *Can. J. Microbiol.* 59, 294-303.

Komeil, D., Padilla-Reynaud, R., Lerat, S., Simao-Beaunoir, A.-M., and Beaulieu, C. (2014). Comparative secretome analysis of *Streptomyces scabiei* during growth in the presence or absence of potato suberin. *Proteome Sci.* 12: 35.

Kontkanen, H., Westerholm-Parvinen, A., Saloheimo, M., Bailey, M., Ratto, M., Mattila, I., Mohsina, M., Kalkkinen, N., Nakari-Setälä, T. and Buchert, J. (2009). Novel *Coprinopsis cinerea* polyesterase that hydrolyzes cutin and suberin. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 2148-2157.

Krupková, E., Immerzeel, P., Pauly, M., and Schmulling, T. (2007). The TUMOROUS SHOOT DEVELOPMENT2 gene of *Arabidopsis* encoding a putative

methyltransferase is required for cell adhesion and coordinated plant development. *Plant J.* 50, 735-750.

Lambert, D.H., and Loria, R. (1989a). *Streptomyces acidiscabies* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39, 393-396.

Lambert, D.H., and Loria, R. (1989b). *Streptomyces scabies* sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39, 387-392.

Lauzier, A., Simao-Beaunoir, A.M., Bourassa, S., Poirier, G.G., Talbot, B. and Beaulieu, C. (2008). Effect of potato suberin on *Streptomyces scabies* proteome. *Mol. Plant Pathol.* 9, 753-762.

Lawrence, C.H., Clark, M.C., and King, R.R. (1990). Induction of common scab symptoms in aseptically cultured potato tubers by the vivotoxin, thaxtomin. *Phytopathology* 80, 606-608.

Leiner, R.H., Fry, B., Carling, D.E., and Loria, R. (1996). Probable involvement of thaxtomin A in pathogenicity of *Streptomyces scabies* on seedlings. *Phytopathology* 86, 709-713.

Lendzian, K.J. (2006). Survival strategies of plants during secondary growth: barrier properties of phellements and lenticels towards water, oxygen, and carbon dioxide. *J. Exp. Bot.* 57, 2535-2546.

Lerat, S., Simao-Beaunoir, A.-M., and Beaulieu, C. (2009). Genetic and physiological determinants of *Streptomyces scabies* pathogenicity. *Mol. Plant Pathol.* 10, 579-585.

Lerat, S., Simao-Beaunoir, A. M., Wu, R., Beaudoin, N. and Beaulieu, C. (2010). Involvement of the plant polymer Suberin and the disaccharide cellobiose in triggering thaxtomin A biosynthesis, a phytotoxin produced by the pathogenic agent *Streptomyces scabies*. *Phytopathology* 100, 91-96.

Lerat, S., Forest, M., Lauzier, A., Grondin, G., Lacelle, S., and Beaulieu, C. (2012). Potato suberin induces differentiation and secondary metabolism in the genus *Streptomyces*. *Microbes environ.* 27, 36-42.

Lin, E., and Wilson, D.B. (1987). Regulation of  $\beta$ -1,4-endoglucanase synthesis in *Thermomonospora fusca*. *Appl. Environ. Microb.* 53, 1352-1357.

Lin, T. S. and Kolattukudy, P. E. (1978). Induction of a biopolyester hydrolase (cutinase) by low levels of cutin monomers in *Fusarium solani f.sp. pisi*. *J. Bacteriol.* 133, 942-951.

Lin, Y.-S., Kieser, H.M., Hopwood, D.A., and Chen, C.W. (1993). The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. *Mol. Microbiol.* *10*, 923-933.

Lloyd, A.B. (1969). Behaviour of *Streptomyces* in soil. *J. gen. Microbiol.* *56*, 165-170.

Locci, R. (1994). Actinomycetes as plant pathogens. *Eur. J. Plant Pathol.* *100*, 179-200.

Lopes, M.H., Pascoal Neto, C., Barros, A.S., Rutledge, D., Delgadillo, I., and Gil, A.M. (2000). Quantitation of aliphatic suberin in *Quercus suber* L. Cork by FTIR spectroscopy and solid  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy. *Biopol. –Biospect. Sect.* *57*, 344-351.

Loria, R., Coombs, J., Yoshida, M., Kers, J., and Bukhalid, R. (2003). A paucity of bacterial root diseases: *Streptomyces* succeeds where others fail. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* *62*, 65-72.

Loria, R., Kers, J., and Joshi, M. (2006). Evolution of plant pathogenicity in *Streptomyces*. *Annu. Rev. Phytopathol.* *44*, 469-487.

Loria, R., Bignell, D.R., Moll, S., Huguet-Tapia, J.C., Joshi, M.V., Johnson, E.G., Seipke, R.F., and Gibson, D.M. (2008). Thaxtomin biosynthesis: the path to plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. *Anton. Leeuw.* *94*, 3–10.

Lulai, E.C., and Corsini, D.L. (1998). Differential deposition of suberin phenolic and aliphatic domains and their roles in resistance to infection during potato tuber (*Solanum tuberosum* L.) wound-healing. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* *53*, 209-222.

Mackenzie, C. R., Bilous, D., Schneider, H. and Johnson, K. G. (1987). Induction of cellulolytic and xylanolytic Enzyme Systems in *Streptomyces spp.* *Appl. Environ. Microbiol.* *53*, 2835-2839.

Maki, M., Leung, K.T., and Quin, W. (2009). The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. *Int. J. Biol. Sci.* *5*, 500-516.

McQueen, D.A.R., and Schottel, J.L. (1987). Purification and characterization of a novel extracellular esterase from pathogenic *Streptomyces scabies* that is inducible by zinc. *J. Bacteriol.* *169*, 1967-1971.

Meimoun, P., Tran, D., Baz, M., Errakhi, R., Dauphin, A., Lehner, A., Briand, J., Biligui, B., Madiona, K., Beaulieu, C., and Bouteau, F. (2009). Two different signaling pathways for thaxtomin A induced cell death in *Arabidopsis* and tobacco BY2. *Plant Signal Behav.* *4*, 142–144.

Melotto, M., Mecey, C., Niu, Y., Chung, H.S., Katsir, L., Yao, J., Zeng, W., Thines, B., Staswick, P., Browse, J., Howe, G.A., and He, S.Y. (2008) A critical role of two positively charged amino acids in the Jas motif of *Arabidopsis* JAZ proteins in mediating coronatine- and jasmonoyl isoleucine-dependent interactions with the COI1 F-box protein. *Plant J.* 55, 979–988.

Miguélez, E.M., Hardisson, C., Manzanal, M.B. (1999). Hyphal death during colony development in *Streptomyces antibioticus*: Morphological evidence for the existence of a process of cell deletion in a multicellular prokaryote. *J. Cell Biol.* 145, 515-525.

Mitchell, R.E., and Young, H. (1985). N-Coronafacoyl-L-isoleucine and N-coronafacoyl-L-alloisoleucine, potential biosynthetic intermediates of the phytotoxin coronatine *Phytochemistry*, 24, 2716-2717.

Moire, L., Schmutz, A., Buchala, A., Yan, B., Stark, R.E., Ryser, U. (1999). Glycerol is a suberin monomer. New experimental evidence for an old hypothesis. *Plant Physiol.* 119, 1137-1146.

More, H. and Ito, K. (2001). The Sec protein-translocation pathway. *Trends Microbiol.* 9, 494-500.

Natsume, M., Ryu, R., and Abe, H. (1996). Production of phytotoxins, concanamycins A and B by *Streptomyces* spp. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn* 62:411–413.

Natsume, M., Taki, M., Tashiro, N., and Abe, H. (2001). Phytotoxins production and aerial mycelium formation by *Streptomyces scabies* and *S. acidiscabies* in vitro. *J. Gen. Plant Pathol.* 67, 299-302.

Natsume, M., Komiya, M., Koyanagi, F., Tashiro, N., Kawaide, H., and Abe, H. (2005). Phytotoxin produced by *Streptomyces* sp. causing potato russet scab. *J. Gen. Plant Pathol.* 71:364–369.

Neubauer, J.D., Lulai, E.C., Thompson, A.L., Suttle, J.C., Bolton, M.D. and Campbell, L.G. (2010). Molecular and cytological aspects of native periderm maturation in potato tubers. *J. Plant Physiol.* 170, 413-423.

Neubauer, J.D., Lulai, E.C., Thompson, A.L., Suttle, J.C., Bolton, M.D., and Campbell, L.G. (2013). Molecular and cytological aspects of native periderm maturation in potato tubers. *J. Plant Physiol.* 170, 413-423.

Padilla-Reynaud, R., Simao-Beaunoir, A.-M., Lerat, S., Bernards, M.A., and Beaulieu, C. (2015). Suberin regulates the production of cellulolytic enzymes in *Streptomyces scabiei*, the causal agent of potato common scab. *Microbes Environ.* 30, 245–253.

- Pagé, N., Kluepfel, D., Shareck, F. and Morosoli, R. (1996). Increased xylanase yield in *Streptomyces lividans*: dependence on number of ribosome-binding sites. *Nat. Biotechnol.* **14**, 756-759.
- Palmer, T., and Berks, B.C. (2012). The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 483-496.
- Papagianni, M. (2004). Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnol. Adv.* **22**, 189-259.
- Pollard, M., Beisson, F., Li, Y., Ohlrogge, J.B. (2008). Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends Plant Sci.* **13**, 236-246.
- Pranata, J., and Jorgensen, W.L. (1991). Monte Carlo simulations yield absolute free energies of binding for guanine-cytosine and adenine-uracil base pairs in chloroform. *Tetrahedron.* **47**, 2491-2501.
- Purdy, R.E., and Kolattukudy, P.E. (1975). Hydrolysis of plant cuticle by plant pathogens. Purification, amino acid composition, and molecular weight of two isozymes of cutinase and a nonspecific esterase from *Fusarium solani* f.sp. *pisi*. *Biochemistry.* **14**, 2824-2831.
- Reeve, R.M., Hautala, E., and Weaver, M.L. (1969). Anatomy and compositional variation within potatoes. *Am. Potato J.* **46**, 361-373.
- Ridley, B.L., O'Neill, M.A., and Mohnen, D. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* **57**, 929-967.
- Rose, R.W., Bruser, T., Kissinger, J.C., and Pohlschroder, M. (2002). Adaptation of protein secretion to extremely high-salt conditions by extensive use of the twin-arginine translocation pathway. *Mol. Microbiol.* **45**, 943-950.
- Rousselle, P., Robert, Y., and Crosnier, J.C. (1996). La pomme de terre: production, ennemis et maladies, utilisation. INRA, ITCF: Paris, 607 p.
- Rowe, R.C., and Powelson, M.R. (2002). Potato Early Dying: Management challenges in a changing production environment. *Plant Dis.* **86**, 1184-1193.
- Ruiz-Arribas, A., Sanchez, P., Calvete, J. J., Raida, M., Fernandez-Abalos, J. M. and Santamaria, R. I. (1997). Analysis of *xysA*, a gene from *Streptomyces halstedii* JM8 that encodes a 45-kilodalton modular xylanase, Xys1. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2983-2988.

- Ryser, U., Meier, H. and Holloway, P.J. (1983). Identification and localization of suberin in the cell walls of green cotton fibres (*Gossypium hirsutum* L., var. green lint). *Protoplasma* 117,196-205.
- Sabba, R.P., and Lulai, E.C. (2002). Histological analysis of the maturation of native and wound periderm in potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber. *Ann. Bot.* 90,1-10.
- Sääf, A., Andersson, H., Gafvelin, G., and Heijnet, G.V. (2000). Sec A-dependence of the translocation of a large periplasmic loop in the *Escherichia coli* malf inner membrane protein is a function of sequence context. *Mol. Membr. Biol.* 12, 209-215.
- Saritha, M., Arora, A., Surender, S and Lata, N. (2013). *Streptomyces griseorubens* mediated delignification of paddy straw for improved enzymatic saccharification yields. *Bioresources Technol.* 135, 12-17.
- Sargent, F., Bogsch, E.G., Stanley, N.R., Wexler, M., Robinson, C., Berks, B.C., and Palmer, T. (1998). Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway. *EMBO J.* 17, 3640-3650.
- Scheible, W.-R., Fry, B., Kochevenko, A., Schindelasch, D., Zimmerli, L., Somerville, S., Loria, R., and Somerville, C.R. (2003). An Arabidopsis mutant resistant to thaxtomin A, a cellulose synthesis inhibitor from *Streptomyces* species. *Plant Cell* 15, 1781–1794.
- Scheller, H.V. and Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61, 263-289.
- Schlösser, A., Jantos, J., Hackmann, K., and Schrempf, H. (1999). Characterization of the binding protein-dependent cellobiose and cellotriose transport system of the cellulose degrader *Streptomyces reticuli*. *App. Environ. Microb.* 65, 2636-2643.
- Schreiber, L., Hartmann, K., Skrabs, M., and Zeier, J. (1999). Apoplastic barriers in roots: chemical composition of endodermal and hypodermal cell walls. *J. Exp. Bot.* 50, 1267-1280.
- Schrempf, H., and Walter, S. (1995). The cellulolytic system of *Streptomyces reticuli*. *Int. J. Biol. Macromol.* 17, 353-355.
- Serra, O., Hohn, C., Franke, R., and Figueras, M. (2010). A feruloyl transferase involved in the biosynthesis of suberin and suberin-associated wax is required for maturation and sealing properties of potato periderm. *Plant J.* 62, 277-290.
- Somerville, C. (2006). Cellulose synthesis in higher plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22, 53-78.



Spooner, F.R., Jr., and Hammerschmidt, R. (1989). Characterization of extracellular pectic enzymes produced by *Streptomyces* species. *Phytopathology* 79, 1190.

Sreevidya, M., Gopalakrishnan, S., Kudapa, H., and Varshney, R.K. (2016). Exploring plant growth-promotion actinomycetes from vermicompost and rizosphere soil for yield enhancement in chickpea. *Braz. J. Microbiol.* 47, 85-95.

Stackebrandt, E., Rainey, F.A., and Ward-Rainey, N.L. (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 47, 479- 491.

Stark, R.E., and Garbow, J.R. (1992). Nuclear magnetic resonance relaxation studies of plant polyester dynamics. 2. suberized potato cell wall. *Macromolecules* 25, 149-154.

Tegg, R.S., Melian, L., Wilson, C.R., and Shabala, S. (2005). Plant cell growth and ion flux responses to the *streptomyces* phytotoxin thaxtomin A: calcium and hydrogen flux patterns revealed by the non-invasive MIFE technique. *Plant Cell Physiol.* 46, 638–648.

Thaxter, R. (1891). The potato scab. *Conn. Agric. Expt. Sta. Rept.* 1890, 81-95.

Tsujibo, H., Ohtsuki, T., Iio, T., Yamazaki, I., Miyamoto, K., Sugiyama, M. and Inamori, Y. (1997). Cloning and sequence analysis of genes encoding xylanases and acetyl xylan esterase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. *Appl Environ. Microbiol.* 63, 661-664.

Tucker, S. L. and Talbot, N. J. (2001). Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39, 385-417.

Tyner, D.N., Hocart, M.J., Lennard, J.H., and Graham, D.C. (1997). Periderm and lenticel characterization in relation to potato cultivar, soil moisture and tuber maturity. *Potato Res.* 40, 181-190.

Van den Berg, B., Clemons, W.M.Jr., Collinson, I., Hartmann, E., and Rapoport, T.A. (2004). X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* 427, 36-44.

Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., and Boeijan, W. (2010). Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiol.* 153, 895-905.

Větrovský, T., K.T. Steffen, and P. Baldrian. (2014). Potential of Cometary Transformation of Polysaccharides and Lignin in Lignocellulose by Soil *Actinobacteria*. *PLOS ONE*. 9.

Walter, S., and Schrempf, H. (1996). The synthesis of the *Streptomyces reticuli* cellulase (Avicelase) is regulated by both activation and repression mechanisms. *Mol. Gen. Genet.* 251, 186-195.

Walton, J.D. (1994). Deconstructing the cell wall. *Plant Physiol.* 104, 1113-1118.

Weiner, J., Bilous, P.T., Shaw, G.M, Lubitz, S.P., Frost, L., Thomas, G.H., Cole, J.A., and Turner, R.J. (1998). A novel and ubiquitous system for membrane targeting and selection of cofactor-containing proteins. *Cell.* 93, 93-101.

Wharton P., Driscoll J., Douches, D., Hammerschmidt, R., and Kirk, W. (2007). Common scab of potato. Michigan State University Extension bulletin E-2990. <http://www.potatodiseases.org/pdf/common-potato-scab-bulletin.pdf>.

Widdick, D.A., Dilks, K., Chandra, G., Bottrill, A., Naldrett, M., Pohlschroder, M., and Palmer, T. (2006). The twin-arginine translocation pathway in a major route of protein export in *Streptomyces coelicolor*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 17927-17932.

Wilson, D.B. (1992). Biochemistry and genetics of actinomycete cellulases. *Crit. Rev. Biotechnol.* 12, 45-63.

Wu, X., Lin, J., Zhu J., Hu, Y., Hartmann, K., and Schreiber, L. (2003). Casparian strips in needles of *Pinus bungeana*: isolation and chemical characterization. *Physiol. Plant.* 777,421-424.

Yang, C.C., Huang, C.H., Li, C.Y., Tsay, Y.G., Lee, S.C. and Chen, C.W. (2002). The terminal proteins of linear *Streptomyces* chromosomes and plasmids: a novel class of replication priming proteins. *Mol. Microbiol.* 43, 297-305.

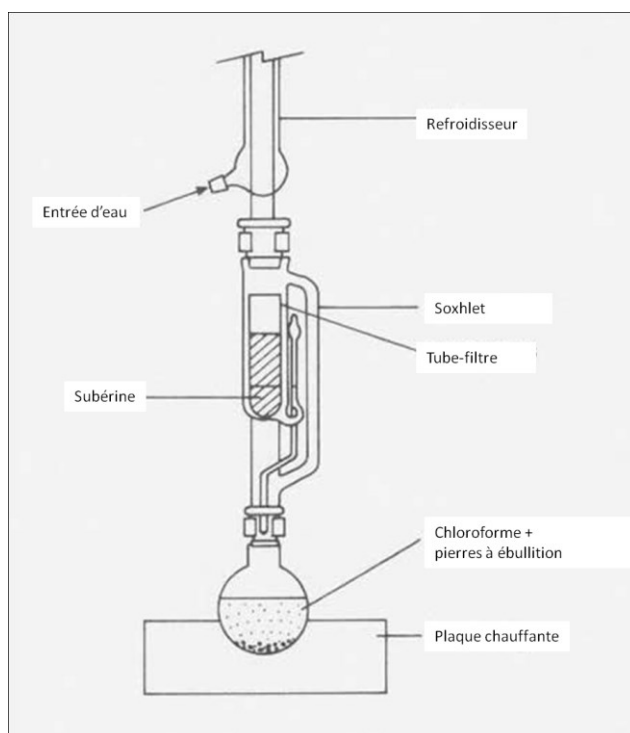
Zeng, J., Singh, D., Laskar, D and Chen. S. (2013). Degradation of native wheat straw lignin by *Streptomyces viridosporus* T7A. *Int. J. of Environ. Sci. Technol.* 10, 165–174

Zhong, R., and Ye, Z.-H. (2009). Secondary cell walls. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-9.

## ANNEXE

### PURIFICATION DE LA SUBÉRINE

Les pommes de terre sont mises dans l'eau bouillante pendant 20 mins. La peau (périderme subérisé) est épluchée et ce qui reste de la chaire est retirée avec un couteau. La pelure est rincée à l'eau courante et le restant de la chaire de pomme de terre est digérée pendant toute la nuit par des cellulases (5 g/L) et des pectinases (1 g/L) dans du tampon acétate 50 mM à pH 4. La pelure est rincée par la suite avec du chloroforme : méthanol (2 :1). Finalement, la purification de la subérine est complétée avec l'extracteur Soxhlet (Figure 4.1) et du chloroforme comme solvant.



**Figure 4.1. Système de purification de subérine avec l'extracteur Soxhlet.**

<https://2tw.wikispaces.com/Extractie>